

Aus der Abteilung Klinische Forschung der
Schering AG., Berlin

1 Berlin 65, Müllerstr. 170

Direktor: Priv.—Doz. Dr. med. G. L a u d a h n

METHODISCHE UND KLINISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR
AUSSCHIEDUNG VON GESAMT-C17-KETOSTEROIDEN,
DEHYDROEPIANDROSTERON, ÄTIOCHOLANOLON UND
ANDROSTERON BEI GESUNDEN UND DIABETISCHEN
FRAUEN

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an der

Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Ingo Koch

aus Berlin

1969

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der
Abteilung Klinische Forschung der
Schering AG., Berlin
1 Berlin 65, Müllerstr. 170
Direktor: Priv.-Doz. Dr. med. G. Laudahn

Methodische und klinische Untersuchungen zur Ausscheidung
von Gesamt-C17-Ketosteroiden, Dehydroepiandrosteron,
Ätiocholanolon und Androsteron bei
gesunden und diabetischen Frauen.

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt
von
Ingo Koch
aus Berlin

Dekan: Prof. Dr. med. H.H. Naumann

Referent: Priv.- Doz. Dr. med. G. Laudahn

Korreferent: Prof. Dr. med. H. Coper



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin.

Promoviert am: 15.4.1969

Diese Arbeit

ist meinen Eltern gewidmet, denen ich an dieser Stelle
dafür danken möchte, mir das Studium der Medizin ermög-
licht zu haben.

INHALTSVERZEICHNIS

I.	Einleitung	1
II.	Material und Methoden	5
1.	Hydrolyseverfahren	5
1.1.	Nachweis der Gesamt-C17-Ketosteroide im Harn nach ZIMMERMANN und KAISER	5
1.2.	Die kombinierte enzymatische Hydrolyse und anschließende Solvolyse der C17-Ketosteroide nach DePAOLI	6
1.3.	Die milde Salzsäurehydrolyse nach FEHER	9
2.	Reinigung der bei den Hydrolyseverfahren 1.1.- 1.3. gewonnenen Extrakte nach GIRARD und SANDOLESKO	11
3.	Chromatographieverfahren	14
3.1.	Papierchromatographie	14
3.2.	Gaschromatographie	16
3.3.	Dünnschichtchromatographie	21
4.	Photometrische Bestimmung der C17-Ketosteroide nach ZIMMERMANN	22
5.	Versuche mit tritiummarkiertem Dehydroepiandrosteron	24
6.	Patientengut	25
7.	Statistische Bearbeitung der Versuchsergebnisse	27

III.	Ergebnisse	29
1.	Probleme der Methodik	29
1.1.	Hydrolysemethoden	29
1.1.1.	Vergleich der Hydrolyse nach KAISER mit der modifizierten Hydrolyse und Solvolyse nach DePAOLI	29
1.1.2.	Vergleich der Hydrolysemethode von KAISER mit der milden Salzsäurehydrolyse von FEHER	31
1.1.3.	Vergleichende Untersuchungen der Methodiken von FEHER und DePAOLI.	34
1.2.	Die Verlustquote der GIRARD-Reinigung	37
1.3.	Gesamtverluste bei der Dehydroepiandrosteronbestimmung	39
1.4.	Die Umsetzung der C17-Ketosteroide zu Tri-fluoracetaten	39
2.	Die Tagesausscheidung an Androsteron, Dehydroepiandrosteron, Ätiocholanolon und der Gesamt-C17-Ketosteroide	41
IV.	Diskussion	45
1.	Vergleich der Hydrolyseverfahren	45
2.	Klinische Untersuchungen	56
2.1.	Steroidausscheidung bei Gesunden und Diabetikerinnen	56
2.2.	Körpergewicht und die Ausscheidung von Dehydroepiandrosteron.	57

V.	Zusammenfassung	61
	Literaturverzeichnis	62

I. EINLEITUNG

In einer 1963 von SONKA, GREGOROVA, SLABOCHOVA¹ und RATH (50) herausgegebenen Arbeit werden die Tagesausscheidung an Dehydroepiandrosteron (3 β -hydroxy-androst-5-en-17-on) im Harn und die Aktivität des Pentose-phosphat-Zyklus in den Erythrozyten von 29 fettsüchtigen Frauen mit den Werten bei einer entsprechenden Gruppe normalgewichtiger Personen verglichen.

Dabei kommen die Autoren zu dem Ergebnis, daß zwischen der Tagesausscheidung an Dehydroepiandrosteron und dem Körpergewicht folgender Zusammenhang besteht:

Mit einer Zunahme des Körpergewichts geht offenbar eine Verminderung der Dehydroepiandrosteronausscheidung im 24-Stunden-Urin, bei gleichzeitiger Steigerung der Umsatzgeschwindigkeit des Pentose-phosphat-Zyklus, einher. Zur Erklärung dieser Ergebnisse wird von den Verfassern eine Veröffentlichung von MARKS und BANKS (41) herangezogen. Danach stellt das Dehydroepiandrosteron neben dem Pregnenolon den natürlichen Inhibitor der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase dar.

Dieses Enzym katalysiert die Eintrittsreaktion der phosphorylierten Glucose in den Pentose-phosphat-Zyklus. Das beteiligte Coenzym dieser Reaktion ist das Nikotinamid-adenindinucleotidphosphat (NADP⁺), das dabei zum NADPH reduziert wird. Eine Verminderung der Dehydroepiandrosteronproduktion im Körper könnte demnach die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenaseaktivität und damit den Substratumsatz im Pentose-phosphat-Zyklus steigern und zugleich einen vermehrten Anfall an NADPH bewirken.

In einer weiteren Veröffentlichung von SONKA, GREGOROVA, JIRANEK, KÖLBEL und MATYS (52) werden die möglichen Folgen der vermehrten Entstehung von NADPH und ihre Auswirkungen auf den intermediären Stoffwechsel diskutiert:

1. Die vermehrt anfallende NADPH-Menge führt zu einer Zunahme der Synthese von Fettsäuren, Cholesterin und anderen Lipiden, da die Synthese dieser Substanzen im wesentlichen eine NADPH-abhängige Reaktion darstellt. Aus der verstärkten Lipidbiosynthese resultiert schließlich eine Fettsucht.

2. Durch die Zunahme der NADPH-Menge wird eine vermehrte Reduktion von Disulfidbrücken bewirkt.

Da das Insulinmolekül über drei solcher Disulfidbrücken verfügt, die zwischen den Aminosäureketten liegen, könnte durch die vermehrte Reduktion dieser Disulfidbrücken eine partielle Inaktivierung des Insulins eintreten. Dadurch stiege der Blutzuckerwert an und bewirke zugleich eine gesteigerte Insulinausschüttung des Pankreas. Dieses Insulin wird jedoch ebenfalls inaktiviert. Durch Erschöpfung des Pankreas soll dieser circulus vitiosus schließlich zum Diabetes mellitus führen.

Wie zahlreiche Untersuchungen gezeigt haben, liegt beim Diabetes die Insulinkonzentration im Serum höher als bei Gesunden. Dieses Insulin liegt jedoch zum Teil in inaktiver Form vor(52).

Die Hypothese von SONKA et al. könnte also durchaus eine plausible Erklärung dieser Tatsache sein.

3. Da NADPH auch für die Reduktion der Folsäure verantwortlich ist, führt ein vermehrter Anfall zu einer Zunahme der reduzierten Folsäure. Da jedoch die reduzierte Folsäure ein wesentlicher Faktor bei der Synthese der Purinnukleotide ist, könnte es zu einer Zunahme der Purinsynthese mit einem vermeinten Anfall an Harnsäure kommen, wodurch eine Gicht ausgelöst werden kann.

Es ist seit langem bekannt, daß Fettsucht, Diabetes, Gicht, Hyperlipidämie und Hypertonus, wenn auch nicht alle Faktoren gemeinsam, so doch zum Teil kombiniert verhält-

mäßig oft auftreten. So hat z.B. eine Veröffentlichung von BERKOWITZ(3) diese Zusammenhänge aufgezeigt. SONKA et al. versuchen, diese Zusammenhänge mit einem möglichen Mangel an Dehydroepiandrosteron zu erklären(52). Eine Bestätigung dieser Hypothese scheint die eingangs erwähnte Veröffentlichung von SONKA et al.(50) für die Fettsucht zu liefern.

Sowohl bei der Gicht wurden von SONKA et al.(51 u. 53), wie auch beim Hypertonus von KÖLBEL(36) eine Verminderung der Dehydroepiandrosteronausscheidung im Urin beschrieben. Es wurde deshalb ein Dehydroepiandrosteronmangelsyndrom von SONKA und seinen Mitarbeitern postuliert(52). Natürlich kann daraus noch nicht geschlossen werden, daß das im Serum verminderte Dehydroepiandrosteron für diese Krankheiten tatsächlich verantwortlich ist.

So sind z.B. bei der Gicht noch andere Faktoren denkbar, die Einfluß auf die Harnsäurekonzentration haben, wie die Veröffentlichung von CHEIFETZ(8) beweist, und es dürfte daher schwierig sein, alle diese Faktoren im Einzelnen auseinanderzuhalten.

Allerdings könnte eine verminderte Dehydroepiandrosteronausscheidung bei all den oben angeführten Erkrankungen kaum als Zufall angesehen werden.

Leider weist die nach SONKA vorgenommene Bestimmungsmethode des Dehydroepiandrosteron einige Mängel auf, so daß dessen Ergebnisse nicht unbedingt repräsentativ oder beweisend sind. In der Diskussion soll darauf noch näher eingegangen werden.

In der vorliegenden Arbeit soll dem Problem des Dehydroepiandrosteronmangelsyndroms nachgegangen werden. Die Fragestellung lautet im Einzelnen:

1. Welche Methodik eignet sich am besten für den Nachweis von Dehydroepiandrosteron im Harn?
2. Bestehen signifikante Unterschiede zwischen Diabetikern und Gesunden hinsichtlich der Ausscheidung an Dehydroepiandrosteron im Harn?
3. Besteht ein Zusammenhang zwischen dem Körpergewicht und der Tagesausscheidung an Dehydroepiandrosteron?
4. Wie verhalten sich im Hinblick auf die unter 1. - 3. genannten Punkte die Ausscheidungswerte von Ätiocholanolon, Androsteron und der Gesamt-C17-Ketosteroide?

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Hydrolyseverfahren

Es werden drei Hydrolyseverfahren verglichen.

1.1 Nachweis der Gesamt-C17-Ketosteroide im Harn nach ZIMMERMANN und KAISER(28).

Prinzip: Bei starker Ansäuerung des Urins und Erhitzung desselben auf 100°C tritt eine Spaltung der im Urin als Glukuronide und Sulfate vorliegenden C17-Ketosteroide ein.

Da die hydrolysierten Steroidkonjugate nur schlecht wasserlöslich sind, gelingt es leicht, sie mit einem organischen Lösungsmittel annähernd quantitativ auszuschütteln. Die in dem organischen Lösungsmittel befindlichen C17-Ketosteroide können dann zur quantitativen Bestimmung weiter aufgearbeitet werden.

Reagenzien

1. konzentrierte Salzsäure p.A.
2. Kupfersulfat als 10%ige wässrige Lösung
3. Methylenchlorid
4. Natronlauge 30%ig
5. Natriumsulfat sicc. p.A.

Vorgang: 50 ml des gesammelten 24-Stunden-Harnes werden in einen 250 ml-Rundkolben gegossen. Jetzt werden je 5 ml konzentrierte Salzsäure und 5 ml der 10%igen Kupfersulfatlösung hinzugefügt.

Dann wird der Rundkolben in ein Wasserbad, dessen Temperatur 100°C beträgt, gehängt und für 20 Minuten belassen, wobei auf den Schliff des Kolbens ein Rückflußkühler aufgesetzt wird.

Anschließend wird der Harn mit den hydrolysierten Steroidkonjugaten unter fließendem Wasser gekühlt. Danach werden 50 ml Methylenchlorid hinzugefügt und der Harn 15 Minuten

lang ausgeschüttelt. Dann wird die organische Phase mittels eines Scheidetrichters von der Wasserphase getrennt. Da die organische Phase eine Emulsion bildet, müssen die Flüssigkeitsphasen durch Zentrifugieren voneinander getrennt werden. Danach wird der Urin noch einmal in der gleichen Weise extrahiert und anschließend verworfen. Die beiden Methylenchloridextrakte werden dann vereinigt und mit 5 ml 30%iger Natronlauge gewaschen. Dieser Vorgang wird direkt im Scheidetrichter durchgeführt. Die gesammelte Natronlauge wird anschließend mit 15 - 20 ml Methylenchlorid zurückgewaschen und dann verworfen. Das Methylenchlorid, das die freien Steroide enthält wird durch Hinzufügen von Natriumsulfat getrocknet, anschließend filtriert und mittels eines Vakuumrotationsverdampfers bei 40°C eingeeengt. Der Extrakt mit den freien Steroiden wird dann in ein Schliffzentrifugenglas überspült, über Nacht im Exsiccator getrocknet und kann dann zur quantitativen Bestimmung der C17-Ketosteroide weiterverwendet werden.

1.2. Die kombinierte enzymatische Hydrolyse und anschließende Solvolyse der C17-Ketosteroide nach DePAOLI(12).

P r i n z i p: Die im Urin vorliegenden Glukuronid-Steroide werden mit Glukuronidase hydrolysiert, die freien Steroide werden mit einem organischen Lösungsmittel extrahiert, ebenso wie bei der Methode von ZIMMERMANN, die nicht hydrolysierten zurückgebliebenen sulfatierten Steroide mit einem Äther-Äthanolgemisch nach EDWARDS(15) und KELLIE(29) extrahiert.

Die extrahierten Sulfate werden dann mittels des von DePAOLI(12) angegebenen Solvolysenverfahrens hydrolysiert. Beide Steroidextrakte werden anschließend vereinigt und über Nacht im Exsiccator getrocknet, nachdem die Lösungsmittel vorher im Rotationsverdampfer entfernt wurden. Anschließend kann die weitere Aufarbeitung zur quantita-

tiven Bestimmung vorgenommen werden (siehe Schema).

R e a g e n z i e n:

1. β -Glukuronidase
2. wässrige Sodalösung 2,5%ig
3. Äther pro narcosi
4. Äthanol 96%ig mit Benzol vergällt
5. Ammoniumsulfat sicc. p.A.
6. Essigester p.A.
7. Perchlorsäure p.A. 70%ig
8. Eisessig p.A.

V o r g a n g: 100 - 150 ml des 24-Stunden-Harnes werden mit Eisessig unter Kontrolle am pH-Meter auf pH 4,8 eingestellt, anschließend wird der Harn mit β -Glukuronidase (300 E./ml) inkubiert. Eine vorherige Hinzufügung von Toluol zum Harn zur Unterdrückung des Bakterienwachstums ist nicht empfehlenswert, da dabei eine Verfärbung des Enzyms auftritt, die möglicherweise mit einer Inaktivierung desselben einhergeht.

Man läßt den inkubierten Harn mindestens 24 Stunden bei 37°C in einem Wärmeschrank stehen.

Die hydrolysierten Glukuronid-Steroide werden durch zweimaliges Ausschütteln mit je 100 ml Methylenchlorid über 15 Minuten extrahiert, die dabei entstandene Emulsion wird zentrifugiert, die verschiedenen Phase mit einem Scheidetrichter getrennt.

Die vereinigten Methylenchloridextrakte werden zweimal mit je 10 ml 30%iger Natronlauge gewaschen. Die abgetrennte Natronlauge wird dann noch einmal mit Methylenchlorid zurückgewaschen.

Durch Hinzufügen von getrocknetem Natriumsulfat wird dem Methylenchloridextrakt das Wasser entzogen, sodann wird es in einen Rundkolben filtriert und im Vakuumrotationsverdampfer bei 40°C eingeengt.

Die zurückbleibende Wasserphase, die noch die Steroid-

Aufarbeitung von 100 ml Harn
Glukuronidasespaltung bei pH 4,8

Extraktion der hydrolysierten
Glukuronid-Steroide mit
Methylenchlorid.

Extraktion der in der Wasser-
phase zurückgebliebenen Sulfa-
te mit Äther-Äthanol; anschlie-
ßend Solvolyse der Sulfate nach
DePAOLI; dann waschen mit Kali-
lauge.

einengen

Essigester mit
den hydrolysierten
Glukuronid-Steroiden

einengen

Wasserphase wird
verworfen.

Vereinigung der
Extrakte

GIRARD-Trennung

Ätherphase mit den
Nichtketonen wird
verworfen.

Wasserphase enthält
gebundene C17-Ketoste-
roide, die freigesetzt
werden.

Bestimmung der Gesamt-C17-
Ketosteroide nach ZIMMER-
MANN.

Entweder gaschromatographische
Bestimmung von Dehydroepian-
drosteron, Ätiocholanolon und
Androsteron, oder Trennung die-
ser Verbindungen durch die
Papierchromatographie und
anschließende Bestimmung der
Komponenten nach ZIMMERMANN.

Sulfate enthält, wird mit Ammoniumsulfat (50 g/100 ml Harn) versetzt und dreimal mit je 50 ml eines Äther-Äthanol-gemisches (= 3 Teile Äther auf einen Teil Äthanol) ausgeschüttelt.

S o l v o l y s e d e r S u l f a t e :

Der Äther-Äthanol-extrakt wird wiederum zusammengegossen, über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und anschließend im Vakuum eingengt.

Der Rückstand wird über Nacht in einem evakuierten Exsiccator getrocknet und am nächsten Tag in 30 - 50 ml 0,1 molarer Perchlorsäure in Essigester gelöst (= 1 ml 70%iger Perchlorsäure zu 100 ml Essigester; 24 Stunden vor Gebrauch zu mischen) und dann für 16 Stunden bei 37°C im Wärmeschrank belassen. Durch zweimaliges Auswaschen mit 5 ml 10%iger Kalilauge wird anschließend die Perchlorsäure neutralisiert, dann wird noch einmal mit 5 ml Aqua dest. nachgewaschen.

Sämtliche Waschwässer werden mit Essigester zurückgewaschen, der vereinigte Essigester wiederum mit Natriumsulfat getrocknet, filtriert und im Vakuum bei 40°C eingengt. Der Rückstand enthält die gespaltenen Steroid-Sulfate. Beide Extrakte werden mit 96%igen Äthanol zusammen in ein Schliffzentrifugenglas überspült, im N₂-Strom eingengt und im Exsiccator über Nacht getrocknet. Anschließend folgt die weitere Aufarbeitung zur quantitativen Aufarbeitung der Steroide.

1.3. Die milde Salzsäurehydrolyse nach FEHER(16).

P r i n z i p: Der Urin wird auf einen pH-Wert von 1,0 gebracht und bei 92°C längere Zeit in einem Wasserbad belassen.

Im Gegensatz zu der Methode von ZIMMERMANN und KAISER(28) ist der pH-Wert hierbei höher. Dadurch verläuft die Hydrolyse der Steroide wesentlich schonender.

Dazu kommt noch, daß die Hydrolyse in Anwesenheit eines organischen Lösungsmittels erfolgt.

Bei dem von VESTERGAARD und CLAUSSEN(57) angegebenen Verfahren, die Hydrolyse in Anwesenheit eines organischen Lösungsmittels durchzuführen, gehen die schlecht wasserlöslichen hydrolysierten Steroide sofort in das organische Lösungsmittel über und, da dieses einen niedrigeren Siedepunkt als Wasser hat (das hierzu verwendete Benzol weist einen Siedepunkt von rund 81°C auf) wird dadurch einem möglichen Verfall der an sich relativ hitzestabilen C17-Ketosteroide vorgebeugt. Dadurch kann die Hydrolysedauer gefahrlos über längere Zeit ausgedehnt werden. Bei diesem Vorgehen werden vornehmlich die Steroid-Sulfate gespalten.

Die verbleibenden Glukuronid-Steroide werden anschließend gespalten, indem der Urin nach Entfernung des organischen Lösungsmittels noch stärker angesäuert und bei gleichzeitiger Anwesenheit frischen Benzols erneut erhitzt wird. Die vereinigten Benzolextrakte können dann zur Steroidbestimmung weiter aufgearbeitet werden.

R e a g e n z i e n:

1. konzentrierte Salzsäure p.A.
2. Benzol, destilliert
3. Natronlauge, 10%ig
4. Aqua dest.
5. Natriumsulfat sicc.
6. Formalin in Wasser 10%ig

V o r g a n g: 100 ml des 24-Stunden-Harnes werden in einen Rundkolben gegossen, mit konzentrierter Salzsäure und unter Benutzung eines pH-Meters auf einen Wert von pH 1,0 eingestellt. Dann wird 1,0 ml der 10%igen Formalinlösung hinzugegeben. Das Formalin hat die Aufgabe, die Entstehung störender Pigmente während des Hydrolysevorganges einzuschränken. Sodann werden 50 ml destillierten

Benzols hinzugefügt. Der Urin wird dann in ein auf 92°C erhitztes Wasserbad gebracht (mittels eines Thermostaten einreguliert), dort für vier Stunden unter gleichzeitiger Rückflußkühlung belassen und nach der Herausnahme unter unter fließendem Wasser gekühlt. Dann wird der Urin mit der organischen Phase in einen Scheidetrichter gegossen, fünf Minuten lang kräftig durchgeschüttelt und das Benzol abgetrennt.

Die wässrige Phase wird durch Zugabe von 14 ml konzentrierter Salzsäure noch stärker angesäuert. Es werden erneut 50 ml Benzol hinzugefügt und sodann 30 Minuten lang bei 92°C im Wasserbad erhitzt.

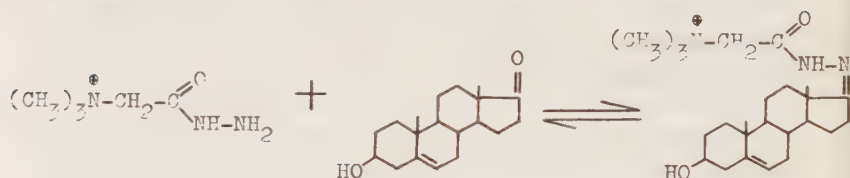
Nach Abkühlung und Durchschütteln für fünf Minuten wird die organische Phase wiederum abgetrennt. Der Urin wird nochmals mit weiteren 50 ml Benzol extrahiert und dann verworfen.

Das gesammelte Benzol wird zweimal mit je 15 ml 10%iger und einmal mit 15 ml Aqua dest. gewaschen. Die Waschwässer werden mit Benzol zurückgewaschen. Das Benzol wird mit Natriumsulfat getrocknet, filtriert und im Vakuumrotationsverdampfer bei 40°C eingeeengt. Der getrocknete Extrakt kann dann zur quantitativen Bestimmung weiterverarbeitet werden.

2. Reinigung der bei den Hydrolyseverfahren 1.1. - 1.3. gewonnenen Extrakte nach GIRARD und SANDOLESKO(20).

P r i n z i p: Beim GIRARD-Reagenz handelt es sich um das Hydrochlorid des Betainhydrazids. Diese Verbindung bildet mit Carbonylgruppen, wie sie auch am C17 der Ketosteroiden auftreten, Hydrazone. Wegen der ausgeprägt hydrophilen Eigenschaften des GIRARD-T-Reagenz werden auch an sich wasserunlösliche Verbindungen, so z.B. die freien C17-Ketosteroiden, durch Umsetzung zu Hydrazonen gut wasserlöslich.

Wasserunlösliche Verbindungen, die in den organischen Lösungsmittel-extrakten enthalten sind und diese Reaktion nicht eingehen, können somit abgetrennt werden. Durch nachfolgende Spaltung der Hydrazone werden die C17-Ketosteroide wieder in organischen Phasen löslich. Auf diese Art werden auch mitgeschleppte wasserlösliche Verunreinigungen entfernt. Für das Dehydroepiandrosteron sei diese Reaktion im Folgenden formuliert:



Reagenzien:

1. GIRARD-T-Reagenz sicc.
2. Eisessig p.A.
3. Aqua dest.
4. Äther pro narcosi
5. Natronlauge 10%ig
6. Schwefelsäure 40%ig
7. Sodalösung 2,5%ig
8. Natriumsulfat sicc.

Vorgang: Zu den, nach einer der oben aufgeführten Methoden 1.1.- 1.3., hydrolysierten und getrockneten Harn-extrakten werden 100 mg GIRARD-T-Reagenz gegeben. Zur Lösung werden 0,5 ml Eisessig hinzugegeben, dann wird in einem Heizblock oder Ölbad von 100°C 3 - 5 Minuten lang erhitzt, um die Umsetzung zu Steroid-Hydrazone herbeizuführen. Das Reaktionsgemisch wird anschließend sofort in Eiswasser gekühlt und in mehreren Portionen mit ins-

gesamt 15 ml Aqua dest. in einen 100 ml Scheidetrichter überspült, der sich in einem Eisbad befindet; auf diese Weise kann die Spaltung der Steroid-Hydrazone vermieden werden. Dazu gibt man 20 ml eisgekühlten Äther und 3 ml 10%iger Natronlauge. Nach dem Ausschütteln läßt man die Wasserphase mit den Steroid-Hydrazonen in einen zweiten Scheidetrichter ab und extrahiert nochmals mit 20 ml eisgekühlten Äthers.

Die Wasserphase wird in einem Erlenmeyerkolben gesammelt, der Äther mit Wasser nachextrahiert und verworfen.

Die gesammelten Wasserphasen werden mit 40%iger Schwefelsäure mit einem pH-Meter auf einen pH-Wert von 1,0 gebracht und mindestens drei Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen.

Die nunmehr wieder freien Steroide werden dann durch dreimalige Extraktion mit je 20 ml Äther aus der schwefelsauren Lösung entfernt, in der das wasserlösliche GIRARD-T-Reagenz verbleibt.

Die Wasserphase wird verworfen, die gesammelten Ätherphasen werden anschließend dreimal mit je 10 ml 2,5%iger Soda-Lösung gewaschen, um die restliche Schwefelsäure zu neutralisieren und noch drei mal mit je 10 ml Aqua dest. nachgewaschen. Die aufgefangenen Wasserphasen werden mit 30 ml Äther nachextrahiert und dann verworfen.

Der Äther wird über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und im Vakuum eingeeengt. Der gewonnene Extrakt kann entweder durch gas- oder papierchromatographische Trennung in die einzelnen C17-Ketosteroide zerlegt und diese bestimmt werden, oder auch zur Bestimmung der C17-Ketosteroide verwendet werden.

Während das gaschromatographische Verfahren ein Meß- und Trennverfahren zugleich ist, deren Ergebnisse nur noch ausgewertet werden müssen, muß bei der Papierchromatographie noch die photometrische Messung der Komponenten nachfolgen, denn bei der photometrischen Messung des nach GIRARD

gereinigten ~~Extraktes~~ wird nur die Summe der Gesamt-C17-Ketosteroide gemessen.

3. Chromatographieverfahren

3.1. Papierchromatographie

P r i n z i p: Durch ungleichmäßige Verteilung verschiedener Substanzen zwischen zwei verschiedenen Phasen, hier flüssig-fest, lassen sich chemisch ähnliche Substanzen voneinander trennen, denn das Verhältnis der Verteilung zwischen den verschiedenen Phasen ist für dieselbe Substanz unter gleichen Versuchsbedingungen immer gleich. Wenn eine Phase, in diesem Falle die flüssige, beweglich ist, werden die verschiedenen Substanzen, je nach dem Grade ihrer Verteilung zwischen den Phasen, unterschiedlich schnell transportiert und somit getrennt.

R e a g e n z i e n:

1. Methanol p.A.
2. Whatman-I-Chromatographiepapier in 25x50 cm-Streifen.
3. Dimethylformamid p.A.
4. Cyclohexan p.A. mit Dimethylformamid p.A. gesättigt.
5. m.-Dinitrobenzol als 1%ige Lösung in 96%igen Ethanol.
6. Kalilauge, 10 n.
7. Chloroform p.A.

V o r g a n g: Die papierchromatographische Trennung des Dehydroepiandrosteron von den anderen C17-Ketosteroiden wird auf mit Methanol gewaschenen Whatman-I-Chromatographiepapier bei absteigender Chromatographie durchgeführt. Die flüssige Phase ist mit Dimethylformamid gesättigtes Cyclohexan. Auf einen 25x50 cm großen Streifen, der im rechten Winkel zur Schnittrichtung der Whatman-I-Bogen hergestellt werden muß, werden aliquote Teile des Harnextraktes, entsprechend 20 - 40 ml Harn, als Doppelwerte

aufgetragen. Die Auftragung erfolgt auf der schmaleren Seite, 10 cm vom Rand.

Da neben dem Dehydroepiandrosteron noch das Ätiocholanolon mitbestimmt werden sollen, wird auf denselben Streifen ein Gemisch der drei Steroide, sowie alle Steroide einzeln aufgetragen. Diese Testgemische dienen zur Identifizierung der im Harn enthaltenen Steroide.

Anschließend wird der Streifen mit Dimethylformamid p.A. imprägniert, wobei man die Stellen mit den aufgetragenen Substanzen trocken läßt.

Nach Ablöschen mit Fließpapier läßt man den Streifen 45 Minuten lang bei Zimmertemperatur an der Luft trocknen, hängt ihn in den Tank (absteigende Chromatographie), gibt die mobile Phase (mit Dimethylformamid gesättigtes Cyclohexan) jedoch erst 45 Minuten später hinzu. Nach 16 Stunden wird der Streifen entnommen und an der Luft getrocknet. Zur Lokalisieren der Steroidzonen wird sowohl das jetzt entmischte Testgemisch, sowie die einzeln aufgetragenen Test-Steroide als auch einer der doppelt aufgetragenen Harnwerte mit dem ZIMMERMANN-Reagenz gefärbt.

Färbung: Die Streifen werden durch eine frisch hergestellte Mischung aus vier Teilen 1%iger alkoholischer m.-Dinitrobenzol-Lösung und ein Teil 10 n. Kalilauge gezogen. Der Reagenzüberschuß wird mit Fließpapier gelöscht. Dann werden die Streifen drei Minuten lang im Trockenschrank bei 70°C erhitzt. Dabei werden die Steroidzonen blau angefärbt.

Elution der Steroide: Die festgestellten Steroidzonen werden in rechteckigen Streifen ausgeschnitten, zusammengewickelt und mit einem kleinen Kunststoffring zusammengehalten und dann an die umgebogene Spitze einer Kanüle der Größe 1 gehängt.

Die Kanüle wird auf eine senkrecht aufgehängte 10 ml-

Rekordspritze geschoben, die erst mit 10 ml Methanol, dann mit 10 ml Chloroform gefüllt wird.

Die Elutionsflüssigkeit wird aufgefangen, im Vakuum eingengt und der Rückstand der einzelnen C17-Ketosteroide nach ZIMMERMANN(58) bestimmt.

3.2. Die Gaschromatographie

P r i n z i p: Bezüglich des Prinzips gilt im wesentlichen das unter der Rubrik : Papierchromatographie Gesagte. Die Flüssigkeitsphase wird hierbei lediglich durch eine Gasphase ersetzt; die Betriebstemperatur des Gaschromatographen liegt dabei weit über der Zimmertemperatur. Die einzige Voraussetzung, die zur gaschromatographischen Bestimmung erfüllt werden muß, ist die, daß die nachzuweisende Substanz verdampfbar sein muß und dabei unzersetzt, oder in immer gleichen Verhältnissen zersetzt, bleiben muß.

R e a g e n z i e n:

1. Äthanol 96%ig, p.A.
2. Trifluoressigsäureanhydrid p.A.
3. Benzol p.A.
4. Methanol p.A.
5. Chloroform p.A.
6. Dehydroepiandrosteron, 2 mg% in 96%igem Äthanol
7. Ätiocholanolon, 2 mg% in 96%igem Äthanol
8. Androsteron, 2 mg% in 96%igem Äthanol
9. Testsubstanz "4862" (1.4-Androstandien-3-on) als 2 mg%ige Lösung in 96%igem Äthanol
10. Chromosorb G, Teilchengröße: 80 - 100 mesh
11. Diaethylenglykolsebacat (DEGSB)

V o r g a n g: Der nach GIRARD gereinigte und getrocknete Harnextrakt wird in 10 ml 96%igen Äthanol gelöst. Der Lösung werden aliquote Teile entnommen, die 20 - 50 ml

Harn entsprechen, in ein Schliffzentrifugenglas pipettiert und der Alkohol bei 40°C im Stickstoffstrom verdampft.

Die Umsetzung der C17-Ketosteroide zu Trifluoracetaten nach HARTMANN(25) und VANDENHEUVEL(56).

Zu den im Exsiccator über Nacht gut getrockneten Extrakten werden nacheinander 1,0 ml Benzol und 0,15 ml Trifluoressigsäureanhydrid pipettiert. Da das von mir verwendete Trifluoressigsäureanhydrid der Firma Schuchard z.T. freie Trifluoressigsäure enthielt, muß diese unmittelbar vor der Umsetzung mit den C17-Ketosteroiden durch Destillation entfernt werden. Das Reaktionsgemisch muß zur vollständigen Umsetzung über Nacht stehen bleiben. Dabei entsteht durch Kondensation der Hydroxylgruppe am C3 der C17-Ketosteroide mit dem Trifluoressigsäureanhydrid ein stabiler Ester.

Das Gemisch wird nach Einengung im Stickstoffstrom mit 1,0 ml und 0,5 ml Methanol versetzt.

Durch Reaktion des nicht umgesetzten überschüssigen Anhydrids bildet sich ein flüchtiger Ester, wodurch das überschüssige freie Anhydrid entfernt wird.

Der Extrakt wird, nachdem ihm noch 0,05 mg der Standard-Substanz "4862" (ein nicht acetyliertes, synthetisches Steroid: 1.4.-Androstandien-3-on) als innerer Standard zugestzt wurden, in ein kleines Spitzgläschen überspült und eingeengt.

Zur Einspritzung in den Gaschromatographen wird der Rückstand (= 20 ml - 50 ml Harn) in 2 - 5 Mikroliter Chloroform aufgenommen.

Mit einer Mikrospritze werden dann von jeder Harnprobe mindestens zwei Werte eingespritzt.

Versuchsbedingungen: Es wird ein Gaschromatograph der Firma F & M, Modell "Scientific"

(Großbritannien) verwendet.

Die benutzten Säulen sind Glasspiralen von 2 m Länge mit einem lichten Durchmesser von 2 mm. Die Füllung besteht aus fest gestopftem Chromosorb G (ein Kieselsäurepräparat mit einer Teilchengröße von 80 - 100 mesh), das vorher mit 0,5% Diaethylenglykolesebac(DESGB) imprägniert wurde.

Zur Messung wird ein Flammenionisationsdetektor(FID) verwendet.

Das Trägergas ist Stickstoff; der Eingangsdruck betrug an der Säule 3,2 atü, woraus sich eine Gasgeschwindigkeit von 0,635 cm/Minute errechnet.

Die Säulentemperatur betrug, ebenso wie die des Detektors, 220°C, der Einspritzblock wurde auf 250°C angeheizt.

Die Identifizierung des Dehydroepiandrosteron, des Ätiolanolon und des Androsteron geschieht entweder, indem man jedes dieser Steroide einzeln einspritzt und die absolute Retentionszeit bestimmt und mit den Harnproben vergleicht, oder man bestimmt die relative Retentionszeit, wobei als innerer Standard die Substanz "4862" verwendet wird.

Das letztere Verfahren ist sicherer, da die relative Retentionszeit ein Wert ist, der weitgehend von den Versuchsbedingungen, die sich aus einer schwankenden Gasgeschwindigkeit ergeben, unabhängig ist.

Auswertung: Zur quantitativen Auswertung werden die automatisch aufgetragenen Peakflächen der einzelnen identifizierten Steroide errechnet. Da die Peakflächen praktisch Dreiecke bilden, werden sie als Dreiecke berechnet (Höhe x Breite in halber Höhe). Die Verwendung eines Korrekturfaktors erübrigt sich, da dieser bei allen Dreiecksflächen praktisch gleich und damit auch der Fehler gleich ist.

Als Bezugswert wird die Peakfläche mit der des als

inneren Standard verwendeten künstlichen Steroids "4862" verglichen. Da der Wert des Verhältnisses: Menge Substanz zur Peakfläche sowohl für jedes der oben angeführten Steroide, wie auch für die Standardsubstanz gleich ist, besteht auch zwischen diesen einzelnen Werten eine Konstanz, die z.B. für das Dehydroepiandrosteron folgendermaßen formuliert werden kann:

$$\frac{\text{Mikrogramm Dehydroepiandrosteron}}{\text{Peakfläche Dehydroepiandrosteron}} = \text{Const.} \times \frac{\text{Mikrogr.Subst.4862}}{\text{Peakflä.Subst.4862}}$$

Die Konstante muß vorher errechnet werden. Man erhält sie, wenn bekannte Mengen der zu bestimmenden Substanzen in den Gaschromatographen injiziert werden, deren Peakflächen errechnet und die Gleichung nach der Konstanten aufgelöst wird.

Diese Konstante ist für das Dehydroepiandrosteron, das Ätiocholanolon und das Androsteron jeweils verschieden und muß daher für jede Verbindung gesondert bestimmt werden.

Da diese drei Komponenten und die Eichsubstanz unter den angegebenen Versuchsbedingungen gut voneinandertrennt werden, ist nur ein Testchromatogramm aller vier Verbindungen notwendig. (Abbildung 1)

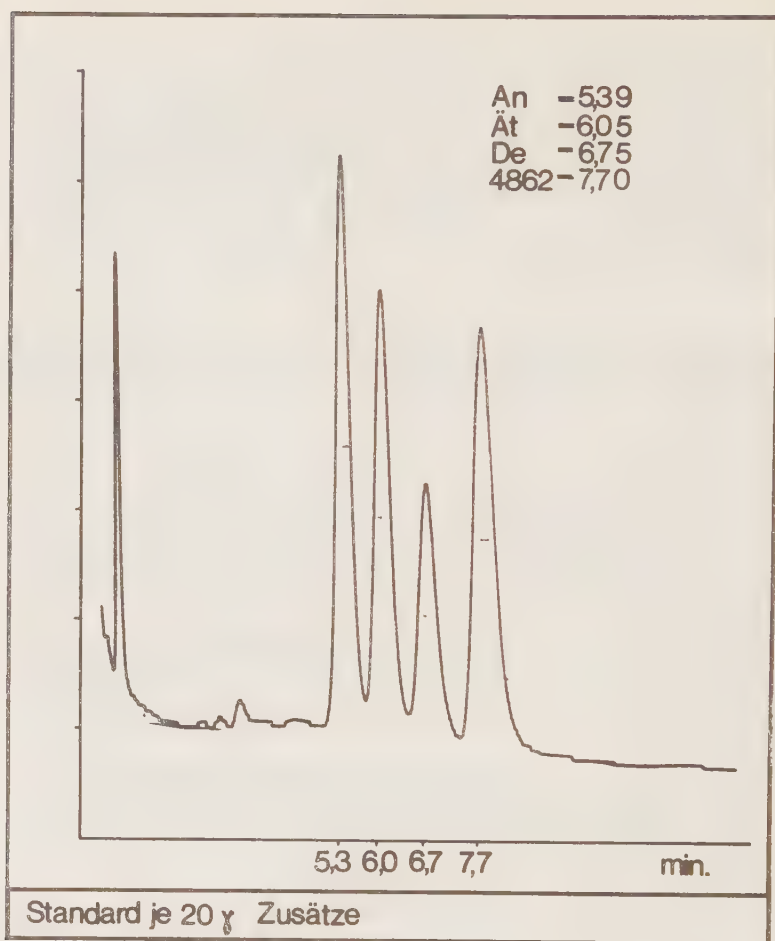


Abb.1: Eichchromatogramm von Androsteron(An), Ätiocholanolon(Ät), Dehydroepiandrosteron(De) und der Eichsubstanz 4862. Die zugesetzte Menge betrug bei allen Steroiden 0,02 mg. Auf der Abszisse die absoluten Retentionszeiten, auf der Ordinate die Mengen; da sie für jede Substanz jedoch verschiedene Maßunterteilungen aufweist, wurde auf eine quantitative Einteilung verzichtet.

3.3. Dünnschichtchromatographie

P r i n z i p: Bezüglich des Prinzips gilt das unter der Papierchromatographie Gesagte, nur besteht hier die feste Phase aus einer Kieselgelschicht, das auf eine Glasplatte aufgetragen wird.

Die Dünnschichtchromatographie wurde in diesem Falle nicht zur Trennung der C17-Ketosteroide, sondern zur Chromatographie der Trifluoracetate der umgesetzten Steroide verwendet.

R e a g e n z i e n:

1. Glasplatten 20 x 20 cm
2. Aqua dest.
3. Kieselgel G nach Stahl
4. Hexan-Essigester gemisch 1:2
5. Dehydroepiandrosteron, Ätiocholanolon und Androsteron, jeweils 0,1 mg zu Trifluoracetaten umgesetzt.

V o r g a n g: Die Beschichtung der Platten erfolgte nach der Methode von COHN(9). Auf die imprägnierten Platten werden die Steroide auf einer 2 cm vom Rand entfernten Startlinie aufgetragen. Jedes der drei erwähnten Steroide wird auf etwa 1,5 cm verteilt, zwischen den Steroidzonen läßt man eine 2 cm lange Strecke frei. Außerdem trägt man noch ein Gemisch aller drei Verbindungen auf eine gemeinsame Startlinie auf.

Die Platte wird dann in einen Tank gestellt, dessen Boden etwa 1 cm hoch mit Hexan-Essigester gemisch 1:2 bedeckt ist. Man läßt die flüssige Phase 15 cm hochsteigen (ca. 45 Minuten), nimmt die Platte dann heraus und läßt sie an der Luft trocknen.

Die Platten werden dann in einem Wärmeschrank auf 70°C erhitzt und die noch warme Platte mit dem ZIMMERMANN-Reagenz besprüht (s.S.15).

Damit kann man die Steroidzonen lokalisieren. Es werden

sowohl die freien, wie auch die acylierten Steroide angefärbt.

Außerdem kann man anhand der Intensität der Farbflecken grobe quantitative Angaben machen.

4. Photometrische Bestimmung der C17-Ketosteroide nach ZIMMERMANN (58).

P r i n z i p: Mit Hilfe des von ZIMMERMANN angegebenen Reagenz bilden die C17-Ketosteroide eine rot gefärbte Verbindung, deren Farbintensität direkt proportional der Konzentration der enthaltenen Steroide ist.

Damit gehorcht diese Verbindung dem LAMBERT-BEER'schen Gesetz: $\log \frac{I}{I_0} = e \cdot c \cdot d$ (wobei e den als Extinktionskoeffizienten bezeichneten Proportionalitätsfaktor darstellt, I_0 =Lichtintensität vor Messung, I =Lichtintensität nach Messung, c =Konzentration des zu messenden Agens, d =Küvettdurchmesser in Lichtrichtung) und kann somit mit Hilfe einer Eichkurve quantitativ bestimmt werden.

R e a g e n z i e n:

1. Methanol p.A.
2. Äthanol p.A.
3. m-Dinitrobenzol als 0,5%ige Lösung in 96%igem Äthanol
4. Benzyltrimethylammoniumhydroxydlösung als 40%ige wässrige Lösung (SCHUCHARD)
5. Dehydroepiandrosteron, 2 mg%, in 96%igem Äthanol

V o r g a n g: Es kann entweder der nach GIRARD gereinigt Extrakt vor der Papierchromatographie zur Bestimmung der Gesamt-C17-Ketosteroide, oder die Elutionsextrakte nach der Papierchromatographie zur Bestimmung der Komponenten verwendet werden.

Der Harnextrakt wird dazu in 5 ml Äthanol aufgenommen; davon werden aliquote Teile, die 2 ml Harn entsprechen (=0,2 ml), mit einer Enzymtestpipette in vorher mit

Methanol gewaschene Reagenzgläser pipettiert. Den Alkohol läßt man im Stickstoffstrom bei 40°C verdunsten. Jede Probe wird doppelt angesetzt.

A. Zum Ansatz der Reaktion werden 2 Volumenteile der oben angegebenen m-Dinitrobenzollösung mit einem Volumenteil der Benzyltrimethylammoniumhydroxydlösung gemischt, wobei man ein dunkles Glas benutzt.

B. Zur Ermittlung des Reagenzienleerwertes und des Pigmentleerwertes (der für jeden Harn mitbestimmt werden muß) wird eine Mischung von zwei Volumenteilen Äthanol mit einem Volumenteil der Benzyltrimethylammoniumhydroxydlösung hergestellt.

Zur Messung müssen angesetzt werden:

1. eine Doppelbestimmung des Reagenzienleerwertes
2. für jeden Harn ein Pigmentleerwert
3. für jeden Harn zwei Meßwerte
4. eine Eichkurve zur Ablesung der Meßwerte

Zu 1.: Man pipettiert 0,15 ml der unter A. angegebenen Lösung in ein sauberes Reagenzglas.

Zu 2.: Man pipettiert zum eingeengten Harnextrakt ebenfalls 0,15 ml der unter A. genannten Lösung.

Zu 3.: Zum eingeengten Harnextrakt werden 0,15 ml der unter B. angeführten Lösung pipettiert.

Zu 4.: Aus einer vorher hergestellten 2 mg%igen äthanolischen Dehydroepiandrosteron-Eichlösung werden aliquote Teile, die 2, 4, 8, 16, 24, 32, und 40 Mikrogramm Dehydroepiandrosteron entsprechen, in Reagenzgläser pipettiert und der Alkohol im Stickstoffstrom eingeengt.

Zu jedem Glas werden ebenfalls 0,15 ml der unter B. angegebenen Lösung hinzugefügt.

Beim Ansatz geht man so vor, daß man innerhalb von 5 Minuten jeweils drei der unter Punkt 3. und 4. genannten Proben 0,15 ml der unter B. angegebenen Farbmischung

zusetzt, sie sorgfältig durchschüttelt und sie dann 90 Minuten lang im Dunkeln bei Zimmertemperatur beläßt. Die unter Punkt 1. und 2. genannten Werte werden zuletzt mit der unter A. bezeichneten Lösung angesetzt. Nach 90 Minuten fügt man den Proben in derselben Reihenfolge, wie sie angesetzt wurden, jeweils drei ml Methylalkohol hinzu, mischt gut durch und gießt die Lösung in 10 mm-Küvetten und ermittelt dann die Extinktion am ZEISS-Spektralphotometer bei den Wellenlängen 460, 520 und 580 nm, wobei immer drei Proben am Photometer gleichzeitig gemessen werden. Die ermittelten Extinktionen werden nach ALLEN(1) korrigiert, indem man die Summe der Extinktionen bei 460 nm und 580 nm von der mit 2 multiplizierten Extinktion bei 520 nm abzieht:

$$2E_{520} - (E_{460} + E_{580})$$

Von den sich ergebenden Werten müssen dann noch die ebenfalls nach ALLEN ermittelten jeweiligen Pigment- und Reagenzienleerwerte abgezogen werden. Meist haben diese Zahlen jedoch den Wert 0.

Die korrigierten Extinktionen der Eichwerte werden auf der Ordinate, die dazugehörigen Dehydroepiandrosteronmengen auf der Abszisse aufgetragen.

Die in den Urinproben enthaltenen Mengen werden durch Ablesen auf der Eichgeraden ermittelt, aus den Doppelbestimmungen wird das arithmetische Mittel gewonnen.

Durch Zurückrechnung auf die 24-Stunden-Harnmenge kann die Tagesausscheidung der Gesamt-C17-Ketosteroide, oder der einzelnen Steroide ermittelt werden.

5. Versuche mit tritiummarkiertem Dehydroepiandrosteron

Um die Hydrolysequote der Methode von FEHER zu kontrollieren, wurde zu zwei Harnen je 0,5 mC markierten Dehydroepiandrosteron zugesetzt. Bei einem Harn wurde nach

30 Minuten, 2 und 4 Stunden jedesmal die Benzolphase erneuert.

Beim zweiten Harn wurde die Hydrolyse ohne Unterbrechungen über 4 Stunden durchgeführt.

Bei beiden Harnen wurde anschließend die Verlust- und Hydrolyserate gemessen.

Als Isotop wurde C7-tritiummarkiertes Dehydroepiandrosteronsulfat verwendet. Die Aktivitätsbestimmung erfolgte im Flüssigkeitsszintillationsspektrometer von PACKARD. Zur Kontrolle der Verluste, die bei Reinigung nach GIRARD auftraten, wurde 0,2 mC C7-tritiummarkiertes Dehydroepiandrosteron diesem Reinigungsverfahren unterworfen und der Verlust ebenfalls im Spektrometer von PACKARD gemessen.

Die Harnaufbereitung

Da Zusatzversuche im experimentellen Teil wegen des Fehlens von Glukuronid-Steroiden nicht möglich waren, wurden die Harnen doppelt aufgearbeitet; und zwar derart, daß die eine Fraktion entweder nach der Methode von DePACLI(12) oder nach FEHER(16) hydrolysiert wurden. Die zweite Fraktion wurde immer nach der Methode von ZIMMERMANN und KAISER(28) aufgearbeitet.

Die Hydrolysemethode von KAISER stellt somit den Standard dar, auf den die Ergebnisse der anderen Methoden immer bezogen werden.

Diese Doppelbestimmungen nach zwei Verfahren wurden nur im methodischen Teil der Arbeit vorgenommen.

6. Patientengut

Es wurden die Tagesharnen von 37 stationär behandelten Diabetikerinnen gesammelt, in ihnen die Tagesausscheidung der Gesamt-C17-Ketosteroide nach ZIMMERMANN, die Tagesausscheidung von Dehydroepiandrosteron, Ätiocholanolon und Androsteron gaschromatographisch bestimmt und deren

Ergebnisse mit denen von 12 Normalpersonen verglichen. Die Hydrolyse der Harnе erfolgte nach der von FEHER(16, 17) angegebenen Methode.

Das Durchschnittsalter der Diabetikerinnen betrug 54,3 ($\pm 6,7$) Jahre, das der Normalpersonen 49,1 ($\pm 7,4$) Jahre. Patienten mit einer Leber- oder Nierenschädigung wurden von der Untersuchung ausgeschlossen. Ebenso durften keine Steroidpräparate verabreicht worden sein, denn diese Faktoren verfälschen die 24-Stunden-Steroidausscheidung. Die Diabetikerinnen waren entweder mit Insulin, oder mit Sulfonylharnstoffpräparaten eingestellt; ihre Diät betrug 12 -14 B.E.. Der Nüchternblutzucker lag nie über 200 mg%, die Menge der im 24-Stunden-Harn ausgeschiedenen Glucose überschritt nie den Wert von 20 Gramm. Bei den Diabetikerinnen wurde eine Unterteilung in 5 Gewichtsklassen als Abweichung vom Normalgewicht vorgenommen:

- 1) -5 bis -20 kg 2) 0 bis -5kg 3) 0 bis +5kg
- 4) +5 bis +20 kg 5) +20 kg und mehr.

Dabei bedeutet das positive Vorzeichen "Übergewicht", das negative Vorzeichen "Untergewicht".

Das Normalgewicht wurde einer Tabelle der SOCIETY OF ACTUARIES(49) entnommen.

Außerdem wurde bei den Versuchswerten eine Bestimmung der Regression vorgenommen, wobei die mathematische Beziehung zwischen Über- bzw. Untergewicht und der Tagesausscheidung an Dehydroepiandrosteron ermittelt wurde.

Die Werte einer Gruppe von 34 Diabetikern, von denen sechs Harnе nach der Methode von DePAOLI und 28 nach der Methode von FEHER hydrolysiert wurden, finden nur im methodischen Teil der Arbeit Verwendung, da keine Bestimmung bei männlichen Normalpersonen vorgenommen wurde.

7. Statistische Bearbeitung der Versuchsergebnisse

Da insbesondere die Abhängigkeit der Tagesausscheidung an Dehydroepiandrosteron vom Körpergewicht untersucht werden sollte, wurde für die ermittelten Werte eine Regressionsberechnung mit einem Computer vorgenommen: Modell IBM 7090, Frankfurt a.M., Programm MRP 31.

Nach Gauß ist der wahrscheinlichste Verlauf einer Kurve mit zwei Variablen der, bei dem die Summe der Quadrate der Abweichungen der festgestellten von den unbekannten wahren Werten ein Minimum bildet.

Diese Forderung wird mathematisch mit der Formel:

$$\sum (y - Y) = \text{Min.}$$

ausgedrückt. Die gesuchte Kurve bildet die Funktion:

$$Y = a + bx$$

In die erstere Kurve, bei der durch Bildung des Differenzenquotienten die Forderung von Gauß erfüllt wird, Y durch $a + bx$ ersetzt. Durch Auflösung nach b erhält man den Regressionskoeffizienten:

$$b = \frac{\sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum (x_i - \bar{x})^2} \quad \text{und } a = \bar{y} - b\bar{x}.$$

In diesem Falle stellt y die Tagesausscheidung an Dehydroepiandrosteron und die Abweichungen vom Normalgewicht dar.

Weiterhin wurde der Korrelationskoeffizient nach der Formel:

$$r = \frac{\sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2 \sum (y_i - \bar{y})^2}} = r_{xy} = \frac{s_{xy}}{s_x s_y}$$

berechnet.

Die Signifikanz, als Angabe der Wahrscheinlichkeit der errechneten Regression wird nach der Formel:

$$s_{\Delta} = \sqrt{\frac{s_x^2}{n} + \frac{s_y^2}{n}}$$

ermittelt.

III. ERGEBNISSE

1. Probleme der Methodik

Da zur Hydrolyse der C17-Ketosteroide viele Methoden existieren, galt es, zunächst diejenige ausfindig zu machen, die hinsichtlich der Wiederfindung der einzelnen C17-Ketosteroide die besten Ergebnisse lieferte.

Darüberhinaus ist die Zeitdauer der Aufarbeitung von Bedeutung, denn die Aufarbeitung und fraktionierte Bestimmung der C17-Ketosteroide erfordert mehrere Tage.

Es mußte also eine Hydrolysemethode gefunden werden, die hinsichtlich der Wiederfindung der C17-Ketosteroide und der Zeitdauer des Arbeitsaufwandes optimal war.

1.1. Hydrolysemethoden

Es wurden drei verschiedene Hydrolysemethoden zu vergleichenden Untersuchungen verwendet:

- a) Die enzymatische Hydrolyse, kombiniert mit der modifizierten Solvolyse von DePAOLI(12).
- b) Die modifizierte Methode von FEHER(17), wobei die Hydrolyse bei fallendem pH-Wert in Anwesenheit von Benzol durchgeführt wird.
- c) Die einfache Salzsäurehydrolyse von ZIMMERMANN und KAISER(28). Die Ergebnisse dieser Methode dienen dabei als Standard(100 %), die Prozentangaben der folgenden Hydrolysevergleiche von DePAOLI und FEHER beziehen sich daher immer auf die Ergebnisse der parallel durchgeführten Vergleichshydrolysen der Methode von KAISER.

1.1.1. Vergleich der Hydrolyse nach KAISER mit der modifizierten enzymatischen Hydrolyse und Solvolyse nach DePAOLI.

Bei Vorversuchen hatte sich ergeben, daß die Aufarbeitung der Harne nach Originalanleitung von DePAOLI(12) keine

befriedigenden Ergebnisse lieferte. Es wurde daher zunächst versucht, die Methodik zu optimieren.

1) Vor der Extraktion wurden zunächst die Glukuronid-Steroide mit β -Glukuronidase gespalten, dann wurde der Harn mit Methylenchlorid ausgeschüttelt.

2) Die Extraktion der übrigen Steroide wurde nicht, wie von DePAOLI angegeben, mit Tetrahydrofuran oder Essigester, sondern mit einem Äther-Äthanolgemisch nach EDWARDS(15) im Verhältnis 3:1 durchgeführt.

3) Die Solvolyse der Steroid-Sulfate wurde nicht nur vier Stunden mit 0,01 m Perchlorsäure, sondern mindestens 16 Stunden mit 0,1 m Perchlorsäure durchgeführt.

Um die Brauchbarkeit dieser modifizierten Methode zu prüfen, wurden die Harnen von vier Personen doppelt aufgearbeitet.

Dabei wurde ein Harn nach der bewährten Methode von KAISER, der andere Harn nach der enzymatischen Hydrolyse und Solvolyse von DePAOLI hydrolysiert.

Alle Harnen wurden dann nach GIRARD gereinigt.

Bei einem Harn wurde nur eine Bestimmung der Gesamt-C17-Ketosteroide nach ZIMMERMANN(58), bei zwei Harnen zusätzlich eine Papierchromatographie im System Dimethylformamid-Cyclohexan, wobei das Dehydroepiandrosteron, Ätiocholanolon und Androsteron nach ZIMMERMANN gemessen wurde und bei einem Harn eine Bestimmung der Komponenten mit Hilfe der Gaschromatographie vorgenommen.

Wie aus der Tabelle 1 ersichtlich ist, ist die Ausbeute der Gesamt-C17-Ketosteroide und des Dehydroepiandrosterons bei der modifizierten Methode nach DePAOLI etwas größer, beim Ätiocholanolon sogar erheblich größer als bei der Methode von KAISER. Lediglich die Ausbeute an Androsteron liegt bei der Hydrolysemethode von KAISER höher. Daraus könnte man den Schluß ziehen, daß die modifizierte Methode von DePAOLI der von KAISER überlegen ist. Ob

HARN	METHODE	Ges-17KS	AN	ÄT	DE	%17KS	%AN	%ÄT	%DE
1	KAISER	20.70							
1	DePAOLI	22.50							
2	KAISER	3.45	0.49	0.46	0.49	100	100	100	100
2	DePAOLI	4.15	0.51	0.87	0.48	120	104	189	98
3	KAISER	13.60	3.69	1.46	1.08	100	100	100	100
3	DePAOLI	12.85	2.83	1.66	1.56	95	77	114	145
4	KAISER	20.15	6.14	3.62	1.30	100	100	100	100
4	DePAOLI	21.85	4.20	5.28	1.47	109	69	146	113

Tabelle 1: Vier Vergleichshydrolysen nach KAISER bzw. nach der enzymatischen Hydrolyse und Solvolyse nach DePAOLI. Die Maßeinheit sämtlicher Zahlenangaben beträgt: mg/24 Stunden. AN=Androsteron, ÄT=Ätiocholanolon, DE=Dehydroepiandrosteron, Ges-17KS=Gesamt-C17-Ketosteroide. Die Ergebnisse der Hydrolysen nach KAISER wurden immer gleich 100% gesetzt.

diese Schlußfolgerung berechtigt ist, wurde mit Hilfe der folgenden methodischen Vergleichsuntersuchungen geprüft.

1.1.2. Vergleich der Hydrolysemethode von KAISER(28) mit der milden Salzsäurehydrolyse von FEHER(16,17).

Auch die Methode von FEHER wurde modifiziert, da dadurch die Ausbeute erhöht werden konnte:

a) Die Zeitdauer der Hydrolyse bei pH 1 wurde von zwei auf vier Stunden ausgedehnt.

b) Die Hydrolysetemperatur wurde von 85°C auf 92°C erhöht

c) Die Zeitdauer der nachfolgenden starken Hydrolyse wurde von 20 auf 30 Minuten verlängert; die Hydrolysetemperatur ebenfalls von 85°C auf 92°C erhöht.

Die Kontrolle der Hydrolysequote erfolgte mit tritium-markiertem Dehydroepiandrosteronsulfat. Ein Harn wurde ohne Unterbrechung einer vierstündigen Hydrolyse unterworfen; einen zweiten Harn wurde nach 30 Minuten, zwei und vier Stunden die Benzolphase entnommen und durch frisches Benzol ersetzt.

In den Benzolextrakten wurde die Menge des wiedergefundenen Dehydroepiandrosteron bestimmt (in % der zugesetzten Menge):

HYDROLYSEDAUER	HARN 1	HARN 2
30 Minuten	64%	- -
120 Minuten	73%	- -
240 Minuten	83%	82%

Dieser Versuch zeigt zweierlei:

1. Selbst bei einer vierstündigen Verweildauer des Dehydroepiandrosteronsulfat im Wasser und des freien Steroids nach erfolgter Hydrolyse im Benzol, ist die Hydrolysequote bei beiden Harnen gleich groß, ein Beweis wie schonend das angewandte Verfahren ist.

2. Fast 2/3 des gesamten vorhandenen Dehydroepiandrosterons werden in den ersten 30 Minuten der Hydrolyse freigesetzt, die restlichen 3,5 Stunden erhöhen die Ausbeute lediglich um 19%. Zwar liefern die letzten beiden Stunden noch 10% mehr, jedoch dürfte erst die anschließende starke eine Spaltung des Restes, der so lange widerstanden hat, bewirken. Eine Verlängerung der Hydrolysedauer über vier Stunden erscheint daher nicht sinnvoll.

Nachdem gezeigt worden ist, daß die vorgenommene Änderung der Methode von FEHER etwas höhere Ausbeuten liefert,

als bei Befolgung der Originalvorschrift, muß nun noch die Gleichwertigkeit dieses Hydrolyseverfahrens mit der Standardmethodik von KAISER bewiesen werden.

Dazu wurden wieder vier Harne verschiedener Personen jeweils doppelt, sowohl nach der Methode von KAISER, wie auch nach der veränderten Methode von FEHER, aufgearbeitet. Alle Harne wurden dann nach GIRARD gereinigt. Die Extrakte der Harne 1 und 2 wurden im papierchromatographischen System Dimethylformamid-Cyclohexan in ihre Komponenten getrennt und die Papiereluate nach ZIMMERMANN bestimmt. Die Harne 3 und 4 wurden zu Trifluoracetaten umgesetzt und gaschromatographisch bestimmt.

Die Ergebnisse der Methode von KAISER wurden wiederum gleich 100% gesetzt und dienten somit als Bezugswert. Auf die Bestimmung der Gesamt-C17-Ketosteroide wurde verzichtet(s. Tabelle 2).

HARNE	METHODE	AN	AT	DE	%AN	%AT	%DE
1	KAISER	6.50	1.40	0.35	100	100	100
1	FEHER	6.65	1.91	2.25	102	136	643
2	KAISER	3.87	2.90	0.72	100	100	100
2	FEHER	3.04	2.61	0.83	79	90	115
3	KAISER	1.65	0.50	0.23	100	100	100
3	FEHER	2.50	2.60	0.29	154	520	126
4	KAISER	2.38	1.90	0.49	100	100	100
4	FEHER	2.70	2.20	0.53	113	115	108

Tabelle 2: Vergleich der Hydrolysemethoden von KAISER und FEHER bei vier Harnen. Sämtliche Zahlenangaben in mg/24 Stunden. Die Ergebnisse der Methode von KAISER=100%. AN=Androsteron, AT=Ätiocholanolon, DE=Dehydroepiandrosteron.

Abgesehen von den niedrigeren Werten für Androsteron und Ätiocholanolon beim Harn 2, liegen alle Werte, die mit dem Verfahren von FEHER erhalten wurden höher, z.T. sogar erheblich höher, als bei dem Verfahren nach KAISER. Eine genaue prozentuale Angabe, wieviel diese Differenz beträgt, läßt sich an Hand von vier Vergleichshydrolysen schwerlich errechnen, jedoch kann hier festgestellt werden, daß die Methode von FEHER der von KAISER sicher überlegen ist.

Wenn man die Ergebnisse der Untersuchungen der Methode von FEHER der Tabelle 2 mit den Hydrolysergebnissen der Methode von DePAOLI der Tabelle 1 vergleicht, so könnte man vermuten, daß die Methode von FEHER der von DePAOLI überlegen ist, eine Frage, auf die im folgenden Teil der methodischen Untersuchungen noch näher eingegangen wird.

1.1.3. Vergleichende Untersuchungen der Methodiken von FEHER und DePAOLI.

Um der Frage nachzugehen, welche Methodik nun wirklich die besten Ergebnisse liefert, wurden Vergleichsuntersuchungen der Hydrolysen bei Harnen von 9 Gesunden durchgeführt.

Von jedem Harn wurde wieder je eine Hydrolyse nach der Methode von FEHER und eine nach der Methode von DePAOLI vorgenommen, die Extrakte nach GIRARD gereinigt und das Androsteron, Ätiocholanolon und das Dehydroepiandrosteron gaschromatographisch gemessen. Die Bestimmung der Gesamt-C17-Ketosteroide erfolgte nach ZIMMERMANN.

Tabelle 3 zeigt die durchschnittlichen Werte dieser 9 Versuchspersonen, geordnet nach Methodik. Die Prozentangaben beziehen sich immer auf die durchschnittlichen Ergebnisse der Hydrolysen von FEHER, die immer gleich 100% gesetzt wurden.

Wie man sieht, bestätigt sich hier die Vermutung, nach der

METHODE	AN	ÄT	DE	C17KS	%AL	%ÄT	%DE	%C17KS
FEHER	0.754 ±0.271	0.943 ±0.409	0.417 ±0.191	5.20 ±1.31	100	100	100	100
DePAOLI	0.282 ±0.085	0.671 ±0.319	0.144 ±0.064	5.47 ±2.22	32	61	29	105

Tabelle 3: Vergleichende Untersuchungen der Hydrolyse-
methode von FEHER und DePAOLI bei weiblichen Normalpersonen.
(Durchschnittsalter rd. 49 Jahre). Die Dimension der Zahlen
beträgt: mg/24 Stunden. Die Zahlen wurden aus den Durchschnitts-
werten von 9 Doppelhydrolysen gebildet.

das Hydrolyseverfahren von FEHER dem von DePAOLI überlegen
ist.

So beträgt die Ausbeute des Hydrolyseverfahrens von DePAOLI
beim Androsteron nur 32%, beim Ätiocholanolon 61% und
beim Dehydroepiandrosteron nur 29% gegenüber der der Me-
thode von FEHER.

Nediglich die Menge der gefundenen Gesamt-C17-Ketosteroide
ist beim Verfahren nach DePAOLI etwas höher als bei dem
von FEHER, ein scheinbarer Widerspruch, zu dem weiter unten
noch Stellung genommen wird.

Neben diesen Vergleichsuntersuchungen wurden außerdem
die Harnen von 6 Diabetikern nach dem Hydrolyseverfahren
von DePAOLI und von 28 Diabetikern nach dem Verfahren
von FEHER aufgearbeitet, nach GIRARD gereinigt, das Andro-
steron, Ätiocholanolon und das Dehydroepiandrosteron
gaschromatographisch bestimmt; die Gesamt-C17-Ketosteroide
nach ZIMMERMANN gemessen und die Durchschnittswerte, ana-
log denen der Tabelle 3, gegenübergestellt: Tabelle 4.
Es ergeben sich für das Androsteron 37% (32%), für das
Ätiocholanolon 73% (61%) und für das Dehydroepiandroste-
ron 34% (29%) Ausbeute der Methode von DePAOLI gegenüber

METHODE	AK	AT	DT	17KS	AND	DT	DEHYD
FEHER	0.002 +0.001	0.758 +0.200	0.591 +0.140	5.24 +1.03	100	100	100
DePAOLI	0.208 +0.077	0.458 +0.117	0.442 +0.033	5.23 +1.13	37	72	34

Tabelle 4: Vergleichsuntersuchungen der Hydrolysemethoden von FEHER(28 Diabetiker) und DePAOLI(6 Diabetiker). Im Gegensatz zur Tabelle 3 sind die Versuchspersonen bei beiden Hydrolysen verschieden. Die Mengenangabe beträgt: mg/24 Stunden. Die Ergebnisse der Methode von FEHER sind mit 100% angesetzt. AK=Androsteron, AT=Ätiocholanolon, DT=Dehydrocepiandrosteron, 17KS=C17-Ketosteroide.

der Methode von FEHER. Die Ergebnisse der Tabelle 3 sind in den Klammern aufgeführt. Auffällig ist, daß die Ergebnisse der Tabellen 3 und 4 ein annähernd gleiches Verhältnis der Ausbeuten aufweisen. Da es sich bei dem Versuchskollektiv der Tabelle 4 um Diabetiker, bei denen der Tabelle 3 um gesunde Normalpersonen handelt, könnte eine unterschiedliche Ausscheidung der Gesamt-C17-Ketosteroide eine Übereinstimmung der angeführten Prozentangaben vortäuschen. Wie beide Tabellen zeigen, ist jedoch die Menge der ausgeschiedenen Gesamt-C17-Ketosteroide bei beiden Kollektiven praktisch gleich groß. Auch das Durchschnittsalter der Versuchspersonen ist mit 49 bzw. 47 Jahren bei beiden Gruppen fast gleich.

Darüberhinaus ist noch eine Tatsache erwähnenswert: Während die Gesamt-C17-Ketosteroideausscheidung bei den Methoden von KAISER und FEHER praktisch gleich hoch gefunden wird, beträgt der Anteil des Dehydrocepiandrosteron, Androsteron und des Ätiocholanolon bei der Methode von FEHER etwa 40% der Gesamt-C17-Ketosteroide, bei der Methode von DePAOLI aber jeweils nur etwa 20%.

1.2. Die Verlustquote der GIRARD-Reinigung

Wie bereits erwähnt, beträgt die Wiederfindungsquote des Hydrolyseverfahrens von FEHER beim Dehydroepiandrosteron 83%. Um nun auch die Wiederfindungsrate nach der GIRARD-Reinigung zu bestimmen, wurden 0,2 μ C tritiummarkiertes Dehydroepiandrosteron der in der Methodik angeführten GIRARD-Reinigung unterworfen.

Da die Menge des aktiven Dehydroepiandrosteron verschwindend gering ist (100 μ C = $5 \cdot 10^{-6}$ Gramm), wurden noch 10^{-5} Gramm inaktiven Dehydroepiandrosterons hinzugesetzt, um den Versuch mit annähernd physiologischen Versuchsmengen ablaufen zu lassen.

Die Bestimmung der Wiederfindung ergab bei drei Versuchen: 1. 77,5%, 2. 73,5% 3. 75,2% der ursprünglich vorhandenen Menge.

Um weiterhin zu beweisen, daß die Reinigung nach GIRARD die Steroide nicht verändert, wurden 3 μ C Dehydroepiandrosteron zusätzlich nach GIRARD umgesetzt, der Extrakt im System Dimethylformamid-Cyclohexan chromatographiert und die Aktivitätsverteilung auf der Papierstreifen mit einem Scanner gemessen (Versuchsbedingungen: Gerät FH 49, Spannung: 2,7 kV, Meßrate: $1 \cdot 10^3$, Dämpfung: 3 sec. Eingangsempfindlichkeit: 10 nI, Papiervorschub: 60 cm/h). Diese zeigt Abbildung 2, daß die Aktivität nur in einer Zone läuft, eine Spaltung des Dehydroepiandrosterons ist also nicht eingetreten.

Daß es sich bei dieser Zone tatsächlich um Dehydroepiandrosteron handelt, und nicht um ein Spaltprodukt, wurde durch mitlaufendes freies Dehydroepiandrosteron bewiesen, dessen Entfernung vom Startpunkt mit der Entfernung der aktiven Zone verglichen wurde. In diesem Versuch stimmte die Lage beider Zonen überein.

Es handelt sich also um ein Mischprodukt, daß die Spaltprodukte so schnell verlieren, daß sie verschwinden.

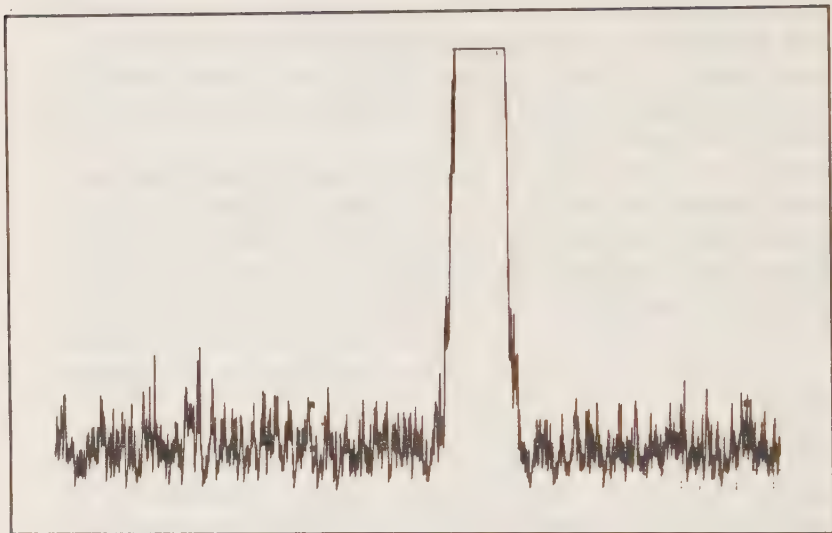


Abbildung 2: Die Aktivitätsverteilung radioaktiv markierten Dehydroepiandrosterons auf dem Papierstreifen nach Papierchromatographie des nach GIRARD umgesetzten Steroids. Der Beginn der Messlinie bezeichnet den Anfang, der Schluß das Ende des Papierstreifens. Es tritt nur eine Aktivitätszone auf, die sich mit vergleichsweise mitchromatographiertem, nicht umgesetztem freien Steroids deckt.

Diese Fehlermöglichkeit wurde durch Auffangen und Aktivitätsmessung des überfließenden Teiles ausgeschlossen. Bei diesem Versuch betrug die gemessene Aktivität des Überflusses 0,2% der zugesetzten Menge, eine Aktivität, die bereits bei Leermessungen auftritt.

Eine Spaltung des Dehydroepiandrosterons konnte somit mit Sicherheit ausgeschlossen werden.

1.3. Gesamtverluste bei der Dehydroepiandrosteronbestimmung.

Unter Zugrundelegung der Wiederfindung von 83% der zugesetzten Substanz nach der Hydrolyse und durchschnittlich 75% nach der GIRARD-Reinigung ergibt sich, daß auch mit optimierter Methodik nur 63% der tatsächlich vorhandenen Menge an Dehydroepiandrosteron erfaßt werden.

1.4. Die Umsetzung der Δ^{17} -Ketosteroide zu Trifluoracetaten.

Um die Haltbarkeit der Trifluoracetate nachzuprüfen, wurden 4 · 100 uGr. freies Dehydroepiandrosteron zu Trifluoracetaten umgesetzt und auf eine Dünnschichtplatte aufgetragen. Zusätzlich wurden dann noch 2 · 10 uGr. freies Dehydroepiandrosteron aufgetragen.

Die Dünnschichtchromatographie wurde im System Hexan-Essigester 1:2 durchgeführt.

Bei dem Ansprühen der Platte mit dem ZIMMERMANN-Reagenz ließ sich zwar eine Spaltung der Trifluoracetate nachweisen, jedoch waren die Farbflecke des wieder zu freien Steroids gespaltenen Trifluoracetats gerade eben sichtbar, was einer Menge von 2 - 4 uGr. entsprechen dürfte. Dieser Versuch wurde wiederholt, jedoch erfolgte die Umsetzung zu Trifluoracetaten dismal in wasserfreiem Benzol. Bei der anschließend im selben System durchgeführte Dünnschichtchromatographie der Trifluoracetate wurden ebenfalls Spuren des freien Dehydroepiandrosterons in gleicher Größenordnung festgestellt.

Diese Ergebnisse beweisen die relative Stabilität der Trifluoracetate und die Unempfindlichkeit der Reaktion gegen Wasserspuren.

Daß die Trifluoracetate die hohe Temperatur der Gaschromatographie (220°C) vertragen müssen, ist klar. Diese Stabilität kann dann angenommen werden, wenn die acetylierte und eingespritzte Reinsubstanz bei der Aufzeichnung immer

nur ein Peak an derselben Stelle liefert.

Wie die Abbildung 3 (siehe auch Abb. 1) zeigt, tritt bei Einspritzung des acetylierten Dehydroepiandrosteron nur ein Peak auf.

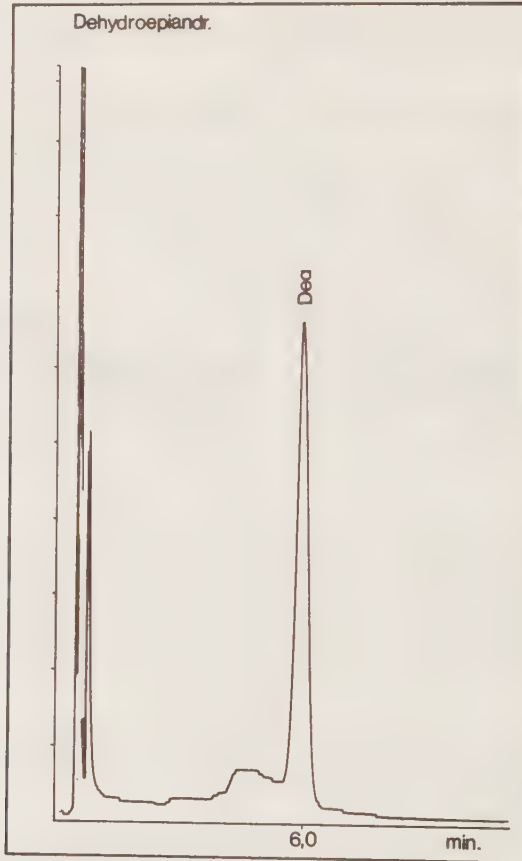


Abbildung 3: Das in den Gaschromatographen eingespritzte, zu Trifluoracetat umgesetzte Dehydroepiandrosteron ergibt immer nur einen Peak. Damit ist die Brauchbarkeit der trifluoracetylierten Steroide zur Gaschromatographie erwiesen.

2. Die Tagesausscheidung an Androsteron, Dehydroepiandrosteron, Ätiocholanolon und der Gesamt-C17-Ketosteroide.

Die Bestimmung der Steroide im Harn bei Diabetikerinnen und Normalpersonen erfolgte durch die Hydrolyse nach FEHER, der Reinigung nach GIRARD und anschließende Einspritzung der Extrakte in den Gaschromatographen.

Die Abbildung 4 zeigt die gaschromatographische Aufzeichnung eines Versuchsharnes.

In der Tabelle 5 sind im oberen Teil die Mittelwerte und die Streuung der Tagesausscheidung an Dehydroepiandrosteron, Androsteron, Ätiocholanolon und der Gesamt-C17-Ketosteroide bei den 12 Normalpersonen angegeben; im unteren Teil werden die entsprechenden Ausscheidungswerte bei 37 Diabetikerinnen angeführt.

	ALTER	AN	ÄT	DE	C17KS
NORMALPERSONEN(12)	49,1	0.734 +0.261	1.074 +0.511	0.332 +0.119	5.35 +1.11
DIABETIKERINNEN(37)	54,3	0.724 +0.371	1.092 +0.391	0.360 +0.197	5.26 +1.45

Tabelle 5: Durchschnittliche Tagesausscheidung von Androsteron(AN), Ätiocholanolon(ÄT), Dehydroepiandrosteron(DE) und der Gesamt-C17-Ketosteroide(C17KS) bei 12 Normalpersonen und 37 Diabetikerinnen in mg/24 Stunden.

Da das Durchschnittsalter der Diabetikerinnen etwas höher ist, als das der Normalpersonen, kommt der Menge der ausgeschiedenen Gesamt-C17-Ketosteroide noch zusätzliche Bedeutung zu.

In Übereinstimmung mit den Angaben von KAISER(28) betragen diese Werte 5,26 mg/Tag bei den Diabetikerinnen, bei den Normalpersonen 5,35 mg /Tag.

Eine wesentliche Differenz der Steroidtagesausscheidung ist bei rund 5 Jahren Altersunterschied der Versuchsgruppen auch nicht zu erwarten. Auch unterscheiden sich die Ausscheidungswerte beider Kollektive nicht signifikant voneinander.

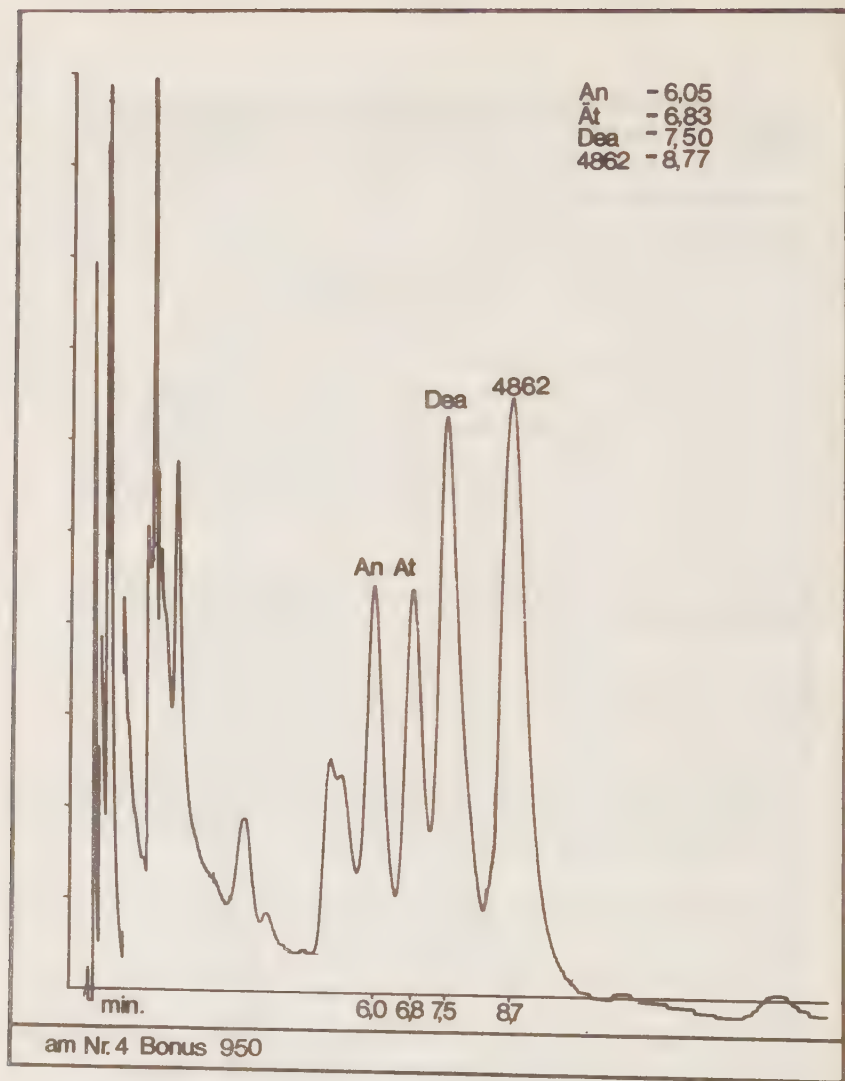


Abbildung 4: Gaschromatogramm von 20 ml eines aufgearbeiteten und eingespritzten Harnextraktes. An=Androsteron, Ät=Ätiocholanolon, Dea=Dehydroepiandrosteron, 4862=Innerer Standard. Die Zahlenangaben der Abszisse und in der rechten oberen Ecke bezeichnen die Retentionszeit in Minuten

Eine Unterteilung der Diabetikerinnen in 5 Gewichtsklassen und anschließende Zuordnung der Ausscheidungswerte der einzelnen Steroide wies darauf hin, daß zwischen der Tagesausscheidung an Dehydroepiandrosteron und dem Gewicht ein Zusammenhang bestehen könnte.

Die Ermittlung der Durchschnittswerte des Ätiocholanolons, des Androsterons und der Gesamt-C17-Ketosteroide zeigte bei derselben Gruppenunterteilung keine Gewichtsabhängigkeit. Eine Varianzanalyse erschien daher nur beim Dehydroepiandrosteron sinnvoll.

Dabei zeigte sich, daß zwischen Körpergewicht und der Dehydroepiandrosterontagesausscheidung der Diabetikerinnen eine signifikante Regression bestand, die mit der vom Computer errechneten Gleichung: $y = +0.398347 - 0.008418 x$ beschrieben werden konnte.

Dabei ist y die Dehydroepiandrosterontagesausscheidung und x die Gewichtsabweichung von der Norm.

Die Signifikanz der Regression errechnet sich zu:

$$F_{90} = 5.0467, \text{ die des } F_{95} = 4.12.$$

Die Korrelation zwischen x und y beträgt: $r = -0.355$. Die Signifikanz der Korrelation beträgt: $t = 2.246$, die des $t_{95} = 2.03$.

Die Regressionskurve ist in der Abbildung 5 graphisch dargestellt und zeigt den signifikanten Abfall der Tagesausscheidung an Dehydroepiandrosteron mit der relativen Gewichtszunahme.

Der Wert 0 der Abszisse bedeutet das Normalgewicht, die Zahlen mit negativen Vorzeichen bezeichnen das Untergewicht, die Zahlen mit positiven Vorzeichen das Übergewicht in kg.

Leider konnte bei den Normalpersonen keine entsprechende Varianzanalyse durchgeführt werden, da die meisten Versuchspersonen hier annähernd normalgewichtig und ihre Anzahl zu gering war.

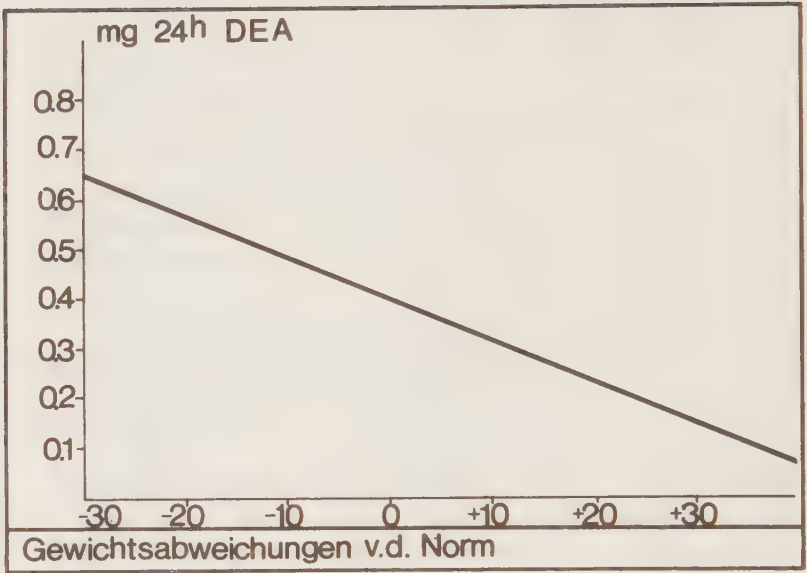


Abbildung 5: Der Zusammenhang zwischen den Abweichungen vom Normalgewicht (in kg auf der Abszisse) und der Dehydroepiandrosterontagesausscheidung (in mg/24 Stunden auf der Ordinate).

IV. Diskussion

Analog der Reihenfolge der Ergebnisse soll auch die Diskussion erfolgen, sodaß zunächst die Ergebnisse der Untersuchungen der Methodik und anschließend die Ergebnisse der Untersuchungen bei den Versuchsgruppen besprochen werden.

1. Vergleich der Hydrolyseverfahren

Der Grund vergleichende methodische Untersuchungen vorzunehmen lag darin, daß sich in Abhängigkeit vom Hydrolyseverfahren erhebliche Unterschiede der Meßwerte ergaben. Die C17-Ketosteroide werden im Urin konjugiert als Glukuronide und Sulfate ausgeschieden.

Dabei gelangt das Ätiocholanolon ausschließlich als Glukuronid, das Androsteron teils als Sulfat, teils als Glukuronid, das Dehydroepiandrosteron nur als Sulfat in den Urin. Diese Untersuchungen wurden unter anderem von KELLIE(30), KIRSCHNER(32), und SEGAL(46) vorgenommen. Die gebräuchlichste, zugleich auch älteste und einfachste Methode zur Hydrolyse der C17-Ketosteroide im Harn besteht darin, den Harn stark anzusäuern und ihn für etwa 20 - 30 Minuten zu kochen. Dann werden die nunmehr freien C17-Ketosteroide mit einem organischen Lösungsmittel extrahiert und mittels der von ZIMMERMANN im Jahre 1935 angegebenen Farbreaktion(58) bestimmt.

Zwar ist diese Methode ursprünglich nur zur summarischen Bestimmung der C17-Ketosteroide verwendet worden, da sich die anwesenden unspezifischen Chromogene hierbei nicht allzu störend bemerkbar machen.

Wie GOLDZIEHER und AXELROD(21) aber nachgewiesen haben, können diese Chromogene besonders die Ergebnisse der Bestimmung der einzelnen Komponenten der C17-Ketosteroide erheblich beeinflussen.

Diese Schwierigkeiten lassen sich durch eine Reinigung nach GIRARD (20) oder durch ein chromatographisches Verfahren, so z.B. nach FEHER(17), umgehen.

Bei diesem Vorgehen können zwar die entstandenen Chromogene abgetrennt werden, die Bildung von Artefakten während der Hydrolyse aus den Steroiden selbst, die eine Veränderung der Werte ergibt, lässt sich jedoch nicht vermeiden.

Es gibt Beweise, daß bei dieser Art der Hydrolyse zahlreiche chemische Veränderungen der Steroide auftreten, wie unter anderem auch die Untersuchungen von DePAOLI(12), DORFMAN(14) und PETERSON et al.(42) gezeigt haben. So sollen besonders bei diesem Verfahren Halogenierungen des Dehydroepiandrosterons auftreten.

Es sollte in dieser Arbeit aber gerade besonderen Wert auf die Ausscheidung an Dehydroepiandrosteron gelegt werden, sodaß es vorteilhaft erschien, ein Verfahren zu wählen, bei dem diese Veränderungen nicht zu erwarten waren.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten die Entstehung von Artefakten zu vermeiden:

a) Die enzymatische Hydrolyse der Steroide mit β -Glukuronidase und anschließende Spaltung der Sulfate mit Hilfe der von SEGAL(46) und DePAOLI(12) angegebenen Solvolyse-methode. Dieses Verfahren ist jedoch sehr aufwendig und daher für den klinischen Betrieb nicht brauchbar.

b) Die milde Säurehydrolyse bei relativ hohen pH-Werten, in Anwesenheit von Benzol, wie sie von VESTERGAARD und CLAUSSEN(57) und von FEHER(17) durchgeführt wird.

Es wurde zunächst das unter a) angeführte Verfahren von DePAOLI(12) zur Hydrolyse der C17-Ketosteroide gewählt. Dieses Solvolyseverfahren ist erstmals von BURSTEIN und LIEBERMANN(6) beschrieben worden.

Das Originalverfahren mußte jedoch in einigen Punkten

verändert und ergänzt werden, sodaß es notwendig war, die Brauchbarkeit des veränderten Verfahrens nachzuweisen. Der Grund dafür lag darin, daß Vorversuche nach der Vorschrift von DePAOLI, verglichen mit der Methode von KAISER (28), unbefriedigende Resultate geliefert haben, wenn auch nicht bei Bestimmung der Gesamt-C17-Ketosteroide, so doch bei den einzelnen Steroiden.

Ausgenommen das Dehydroepiandrosteronsulfat, hat DePAOLI leider keine quantitativen Aussagen hinsichtlich der Solvolysequote der einzelnen Steroide gemacht; die Feststellung der Brauchbarkeit der von ihm angewandten Methode erfolgte immer durch Bestimmung der Gesamt-C17-Ketosteroide, wohl deshalb, weil z.B. das Ätiocholanolon und Androsteron als Glukuronide im Harn ausgeschieden werden. Diese für Zusatzversuche notwendigen Glukuronid-Steroide lassen sich nur außerordentlich schwer herstellen und sind deshalb in der benötigten Menge nicht erhältlich.

Auch mir war es deshalb unmöglich, Zusatzversuche mit Glukuronid-Steroiden durchzuführen. Deshalb wurde die starke Salzsäurehydrolyse, als gebräuchlichste Methode zur Aufarbeitung der Steroide, als Vergleichsstandard herangezogen.

Wie die Tabelle 1 zeigt, besteht bei der Bestimmung der Gesamt-C17-Ketosteroide zwischen der Methode von KAISER (28) und der modifizierten Methodik von DePAOLI (12) nur ein unwesentlicher Unterschied.

Diese Feststellung hat auch DePAOLI in seiner Arbeit gemacht: auch bei ihm liefert die Solvolyse die gleiche Ausbeute an Gesamt-C17-Ketosteroiden, verglichen mit der starken Salzsäurehydrolyse.

Dagegen liegt bei der modifizierten Hydrolyse nach DePAOLI die Ausbeute an Androsteron gegenüber dem Verfahren von KAISER niedriger, die des Dehydroepiandrosteron etwas, die des Ätiocholanolon sogar wesentlich höher.

Es sind verschiedene Ursachen denkbar, warum die Ergebnisse bei Befolgung der Vorschrift von DePAOLI unbefriedigend waren: Wie SEGAL et al(46) in ihrer Arbeit zeigen, ist bei Anwendung der Solvolyse mit Schwefelsäure die Menge des wiedergefundenen Ötiocolanolon praktisch gleich Null, die des Androsteron minimal.

Die Tatsache, daß beide Substanzen im Harn als Glukuronide vorliegen, bietet dafür einige Erklärungsmöglichkeiten, die überprüft werden können:

1. Diese Verbindungen lösen sich schlecht in dem verwendeten Extraktionsmittel Essigester. In diesem Falle muß bei vorheriger Spaltung der Glukuronide mit der spezifischen Glukuronidase die anschließende Extraktion ein besseres Ergebnis liefern.

2. Die Art der verwendeten Säure hat Einfluß auf die Solvolyse der Glukuronide und Sulfate.

3. Die Solvolysebedingungen sind nicht drastisch genug, obgleich die verwendete Säure grundsätzlich geeignet ist.

Es wurden zunächst die Punkte 1 und 3 geprüft, denn die Suche nach einer geeigneten Säure wäre zu zeitraubend geworden.

Die zufriedenstellenden Ergebnisse der Tabelle 1 zeigen, daß entweder Punkt 1 oder 3, oder beide, für die vorherigen ungünstigen Resultate verantwortlich waren, während die verwendete Perchlorsäure offensichtlich für die Solvolyse geeignet ist. Es wurde daher nicht weiter untersucht, ob nur einer der Punkte 1 oder 3 für die besseren Resultate verantwortlich ist, zumal die Veränderung der Solvolysebedingungen keinen größeren Arbeitsaufwand zur Folge hatte, und das Spaltungsverfahren mit der Glukuronidase sicher die schonendste Hydrolyse-methode darstellt.

Der Entschluß, die modifizierte Methode von DePAOLI

zugunsten der von FEHER(16,17)aufzugeben,obgleich ein Teil der Harne nach der modifizierten Methode aufgearbeitet war,hatte drei Gründe:

1. Die Arbeit von FEHER erschien erst einige Zeit nach Aufnahme der Experimente.
2. Die Aufarbeitung der Harne ist bei dieser Methode bei weitem nicht so aufwendig,wie bei der modifizierten Methode von DePAOLI.Einmal ist die Zahl der Arbeitsgänge erheblich geringer,darüberhinaus beträgt die Zeitdauer der Aufarbeitung bis zur Einspritzung in den Gaschromatographen bei der Methode von DePAOLI 5 Tage, bei der von FEHER hingegen nur 3 Tage.
3. Die gewonnenen Extrakte sind bei der Hydrolyse nach FEHER wesentlich sauberer,die Menge der Verunreinigungen betrug im höchsten Falle nur 20% derjenigen,die bei der Aufarbeitung nach der modifizierten Methode von DePAOLI anfallen.

Die günstigen Ergebnisse der Methode von FEHER dürften auf Verbesserung der Säurehydrolyse,die fraktioniert vorgenommen wird,zurückzuführen sein.

Die Idee eine fraktionierte Säurehydrolyse bei verschiedenen pH-Werten durchzuführen,um die Ausbeute zu verbessern,geht auf eine Veröffentlichung von VESTERGAARD und CLAUSSEN(57)zurück.

Das Verfahren,die Hydrolyse in der Anwesenheit von Benzol vorzunehmen,wie es auch von VESTERGAARD und CLAUSSEN getan wird,ist erstmals von HAMBURGER(24) angegeben worden.

Insofern stellt die Methode von FEHER eine Variante der Methode von VESTERGAARD und CLAUSSEN dar,als zur Hydrolyse anstelle von Schwefeläure Salzsäure verwendet wird und die Hydrolyse nicht bei 100°C ,sondern bei 85°C durchgeführt wird.

Wie die durchgeführten Vergleichshydrolysen jedoch zeigen,

scheint die Hydrolyse von FEHER in der angegebenen Zeitdauer von zwei Stunden zu mild zu sein, denn bei Verlängerung der Hydrolysezeit auf vier Stunden und Erhöhung der Temperatur auf 92°C steigt die Ausbeute um 10%. Eine Veränderung der C17-Ketosteroide tritt bei dieser Temperatur nicht ein, denn selbst bei mehrfacher Zwischenextraktion ist das Wiederfindungsergebnis des Dehydroepiandrosterons mit 83% nicht höher als bei einmaliger Extraktion nach längerer Hydrolysedauer.

Ob sich die Wiedergewinnung überhaupt über 85% steigern lässt erscheint fraglich, denn selbst bei Verlängerung der Hydrolysedauer über den Zeitraum von vier Stunden hinaus wurden keine höheren Ausbeuten erzielt.

Ebenso wurden mehrere Hydrolysen nach VESTERGAARD und CLAUSSEN als Zusatzversuche mit radioaktivem Dehydroepiandrosteron durchgeführt, wobei sich gleichfalls eine Wiedergewinnung von 85% ergab.

Auch FEHER (17) gibt in seiner Arbeit bei Zusatz von Dehydroepiandrosteronsulfat eine Wiederfindung von 81% an, ein Ergebnis, das sich also mit den von mir gefundenen Wiederfindungsraten deckt.

In der Veröffentlichung von RUCHELMAN et al. (44) ergibt sich bei Arbeit nach Vorschrift von VESTERGAARD und CLAUSSEN eine Wiederfindung des Dehydroepiandrosterons von 80% und 74%.

Es wurde in dieser Arbeit nicht weiter nachgeprüft, welche Ursachen dem zugrunde lagen; so wäre z.B. eine unvollständige Hydrolyse des Dehydroepiandrosteronsulfates zu diskutieren, denn die Extraktionsverluste nach Hydrolyse betrugen bei Nachprüfung höchstens 6 - 7%.

Der Vorteil der Methode von FEHER, verglichen mit der Glukuronidase-Solvolysespaltung liegt nicht nur in ihrer relativen Unkompliziertheit, sondern auch darin, daß die gewonnenen Extrakte wesentlich sauberer waren und die Menge der Verunreinigungen nur etwa 20% derjenigen des

nach DePAOLI gewonnenen Extraktes betrug.

Des Weiteren hatte FEHER berichtet(16),daß seine Methode höhere Werte für die C17-Ketosteroide ergab,als eine parallel durchgeführte enzymatische Hydrolyse mit nachfolgender Solvolyse.

Zunächst wurde von mir die milde Säurehydrolyse von FEHER mit der starken Salzsäurehydrolyse von KAISER verglichen. Tabelle 2 zeigt die eindeutige Überlegenheit der milden Hydrolysemethode von FEHER über die von KAISER.Dieses Ergebnis deckt sich auch mit dem in der Arbeit von VESTERGAARD und CLAUSSEN.

Wie bereits angeführt wurde,scheinen die annähernd gleichen Hydrolysequoten der Methoden von KAISER und der modifizierten von DePAOLI,und der eindeutigen Überlegenheit der Methode von FEHER über die von KAISER,den Schluß zuzulassen,daß die Methode von FEHER auch der modifizierten von DePAOLI überlegen ist.

Damit bestünde eine Übereinstimmung mit den Ergebnissen von FEHER.

Die Tabellen 3 und 4 beweisen die eindeutige Überlegenheit der Methode von FEHER auch gegenüber der modifizierten von DePAOLI.Damit wird die vorher ausgesprochene Vermutung bestätigt.Daß dieser Unterschied so frappant ist,haben aber weder die Ergebnisse von FEHER,noch die zunächst erhaltenen eigenen Ergebnisse der Vergleichshydrolysen auf Tabelle 2 erwarten lassen.

Ein Grund mag darin liegen,daß die von FEHER als Vergleich durchgeführte enzymatische Hydrolyse und Solvolysespaltung nach einem anderen Verfahren vorgenommen wurde und dabei höhere Ausbeuten geliefert hat.

Die etwas höhere Hydrolysequote des modifizierten Verfahrens von FEHER gegenüber der Normalvorschrift dürfte dagegen nicht ins Gewicht fallen,weil die Verlustquote der zur Bestimmung der C17-Ketosteroide von FEHER durchgeführte Papierchromatographie geringer ist,als die von

mir angewandte GIRARD-Reinigung.

Darüber hinaus haben Beobachtungen von KIRSCHNER(34) gezeigt, daß die Papierchromatographie eine höhere Ausbeute liefert, als die Gaschromatographie. Die Gründe dafür sind nicht bekannt.

Eine mögliche Erklärung dieser Diskrepanzen liefert die Arbeit von VESTERGAARD und CLAUSSEN. Diese Autoren haben bei der isoliert vorgenommenen Solvolyse ebenfalls erheblich geringere Mengen der einzelnen C17-Ketosteroide, als bei der fraktionierten Hydrolyse bei verschiedenen pH-Werten und gleichzeitiger Benzolextraktion gefunden, während die enzymatische Hydrolyse der fraktionierten Hydrolyse gleichwertig war.

Da die modifizierte Methode von DePAOLI eine Kombination der enzymatischen Hydrolyse und der Solvolyse darstellt, wäre eigentlich die Gleichwertigkeit dieses Verfahrens mit dem von FEHER zu erwarten gewesen.

Aus der Arbeit von VESTERGAARD und CLAUSSEN geht jedoch hervor, daß die üblicherweise zur enzymatischen Hydrolyse verwendete Menge von 300 I.E. β -Glukuronidase/ml Harn zu gering und ihre Einwirkzeit mit nur 24 Stunden bei weitem zu kurz ist.

Die von mir verwendete Menge von 300 I.E. β -Glukuronidase/ml Harn und die Einwirkzeit von nur 24 Stunden dürften die ungünstigeren Ergebnisse der modifizierten Methode von DePAOLI erklären, zugleich könnte man annehmen, daß weniger die Solvolysebedingungen (s. Punkt 1 S. 48) für eine verbesserte Ausbeute, als die, wenn auch unzureichende enzymatische Hydrolyse, verantwortlich gemacht werden kann.

Die C17-Ketosteroide sind bei allen Methoden etwa gleich. Die höheren Meßwerte für Dehydroepiandrosteron, Ätiocholanolon und Androsteron bei der Methode von FEHER müßten eigentlich auch einen höheren Wert der Gesamt-C17-Ketosteroide zur Folge haben, beträgt doch der Anteil dieser drei Steroide bei der Methode von FEHER rund 40% der

der Gesamt-C17-Ketosteroide, während er bei der Methode von DeFAOLI nur etwa 20% ausmacht.

Es ist aber denkbar, daß bei der Methode von DeFAOLI die Menge der nicht identifizierten restlichen Ketosteroide höher liegt, als bei der Methode von FEHER. Somit könnte ein Ausgleich eintreten.

Die Beobachtung, daß der Anteil der drei bestimmten Steroide etwa 40% der Gesamt-C17-Ketosteroide ausmacht, trifft übrighends auch für die Papierchromatographie zu (GOLDZIEHER(22), KIRSCHNER(32)).

Unter Zugrundelegung der Wiederfindung von 83% nach der Hydrolyse und 75% nach der Reinigung von GIRARD ergibt sich eine Wiederfindung von 63%; die Wiederfindungsrate von 83% nach der Hydrolyse scheint besser zu sein, als die von anderen Autoren (FEHER(16,17), HAMBURGER(24)) angegebene.

Leider ist es nicht möglich, die gewonnenen Extrakte ohne vorherige Reinigung in den Gaschromatographen zu injizieren, zur Vorreinigung bedienen sich die meisten Autoren, so auch KIRSCHNER(33,34), BROOKSBANK(5), GOTTFRIED(23) und KROMAN(37) der Dünnschichtchromatographie.

Die Verluste der Dünnschichtchromatographie dürften mit etwa 10% angesetzt werden und sind damit erheblich geringer, als bei der Reinigung nach GIRARD(25%).

Von THOMAS(54) wird aber darauf hingewiesen, daß die gaschromatographische Messung der nichtketonischen Fraktion nach der Reinigung mit dem GIRARD-T-Reagenz einen Peak ergab, dessen Retentionszeit sich genau mit der des Androstens deckte, obgleich zwei verschiedene Reinigungsverfahren und zwei verschiedene gaschromatographische Säulen nacheinander verwendet wurden. Um diesen Schwierigkeiten aus dem Wege zu gehen, wurden daher alle Harne der GIRARD-Reinigung unterworfen.

Der dabei entstehende Verlust von etwa 25% hat sich trotz Modifikation der Versuchsbedingungen nicht

verringern lassen.

So wurde z.B. das von ISMAIL et al.(27) zur Reinigung des Testosteron angegebene veränderte GIRARD-Verfahren für die C17-Ketosteroide ausprobiert, die Spaltung der Steroid-Hydrazone ist jedoch bei diesem Verfahren ungenügend. Die Menge der gebildeten Steroid-Hydrazone scheint jedoch gleich zu sein.

Die Gaschromatographie erfordert noch eine vorherige Umsetzung in eine verdampfbare stabile Verbindung.

Die Gaschromatographie der Steroide wurde von VANDENHEUVEL et al.(55) beschrieben.

Die meisten Autoren, so auch VANDENHEUVEL(55), ROSENFELD(43), FRANCE(19), SANDBERG(45) und SJÖVALL(48) überführen die Steroide vor Einspritzung in den Gaschromatographen in Trimethylsilyläther. Wie die Arbeit von KROMAN(37) zeigt, ist aber auch die gaschromatographische Messung der Steroide in freier Form möglich.

Bei mehrfach durchgeführten Dünnschichtchromatographien der zu Trimethylsilyläthern umgesetzten C17-Ketosteroide im System Hexan-Essigester 1:2 haben sich jedoch erhebliche Mengen der freien Steroide nachweisen lassen.

Dieser Nachweis wird dadurch erbracht, daß bei Anfärbung der Platte mit dem ZIMMERMANN-Reagenz die zu Trimethylsilyläther umgesetzten C17-Ketosteroide sich durch die Chromatographie in zwei Farbpunkte aufgeteilt haben, wobei sich der Rf-Wert des einen Punktes mit dem des zusätzlich aufgetragenen freien Steroids deckt.

Eine genaue quantitative Bestimmung des Anteiles an freiem Steroid ist nicht möglich, nach groben Schätzungen dürfte dieser Anteil aber bei 30% - 40% liegen.

Wahrscheinlich ist weniger eine ungenügende Umsetzung, als vielmehr ein sekundärer Zerfall der Trimethylsilyläther dafür verantwortlich.

Wie von LAU(39) nachgewiesen wird, können unter den in der Literatur angegebenen Versuchsbedingungen bereits Spuren von Wasser den Zerfall der Trimethylsilyl-Äther katalysieren. In der vorliegenden Arbeit wurden die Steroide daher als Trifluoracetate bestimmt, ein Verfahren, das von VANDENHEUVEL (56) und HARTMAN(25) verwendet wird.

Dieses Verfahren wird nur selten angewandt, die Ergebnisse beweisen jedoch hinlänglich die Stabilität der Trifluoracetate.

Darüber, ob der freie Anteil bei der Dünnschichtchromatographie auf eine nicht vollständige Umsetzung, oder eine sekundär eintretende Spaltung zurückgeführt werden muß, ist eine Entscheidung nicht möglich.

Praktisch ist die Größenordnung des Verlustes jedoch unerheblich. Daß die Trifluoracetate gut getrennt werden, zeigt das Eichchromatogramm der Abbildung 1; darüberhinaus tritt auch keine Zersetzung der einzelnen Steroide auf. Die Entscheidung, im experimentellen Teil der Arbeit die Papierchromatographie mit heranzuziehen und die einzelnen Steroide photometrisch zu bestimmen, ist darauf zurückzuführen: a) um eine Kontrollmöglichkeit gegenüber der Gaschromatographie in der Hand zu haben.

b) Diese Methode ist ein sehr sicheres und allgemein bekanntes Verfahren, das seine Brauchbarkeit in vielerlei Modifikationen, so z.B. von CALLOW et al.(7) und HOLTORFF et al.(26), bewiesen hat.

Die übereinstimmenden Ergebnisse der Papierchromatographie-Photometrie und der Gaschromatographie sind zugleich der Beweis für die Brauchbarkeit der Gaschromatographie.

2. Klinische Untersuchungen

2.1. Steroidausscheidung bei Gesunden und Diabetikerinnen

Die Überlegenheit der Hydrolysemethode von FEHER gegenüber den anderen Hydrolysemethoden war der Grund, diese Methode zur Bestimmung der in der Klinik gesammelten Versuchsharne heranzuziehen.

Die durchschnittliche Ausscheidung an Dehydroepiandrosteron, Ätiocholanolon und Androsteron ist bei Diabetikerinnen und Normalpersonen praktisch gleich, wie die Gegenüberstellung in der Tabelle 5 beweist. Rückschlüsse auf den Serumspiegel der bestimmten Steroide können daraus jedoch nicht gezogen werden.

Die drei von mir bestimmten Steroide liegen im Serum, nach Untersuchungen von BAULIEU(2), CONRAD(11) und DESTHANDE(13), im Gegensatz zum Urin, fast ausschließlich als Sulfate vor. Aus Arbeiten von KELLIE et al.(31) und BONGIOVANNI(4) geht hervor, daß die Steroid-Sulfate in den Nierentubuli sezerniert werden können. Das bedeutet, daß die ausgeschiedene Menge in keinem Verhältnis zur Plasmakonzentration zu stehen braucht. Mit Bestimmungen der Plasmakonzentrationen könnte man den Einfluß der Niere auf die Ausscheidungsrate erfassen; jedoch sind diese Bestimmungen sehr aufwendig.

So wurden von mir auch orientierende Bestimmungen der C17-Ketosteroide im Plasma vorgenommen, die dann aber wegen des enormen Zeitaufwandes wieder aufgegeben wurden.

Es wurde daher lediglich darauf geachtet, gröbere Beeinflussungen der Werte auf Grund einer gestörten Nierenfunktion auszuschalten.

Deshalb wurden nur Patienten gewählt, die keine klinischen Zeichen eines Nierenschadens aufwiesen.

Die so gefundenen Ausscheidungswerte decken sich mit den von FEHER(18) angegebenen Mengen bei einer gleich alten Frauengruppe hinsichtlich des Dehydroepiandrosterons.

Die von mir gefundenen Durchschnittswerte des Androsteron und Ätiocholanolon sind dagegen etwas geringer, fallen aber in den von FEHER angegebenen Schwankungsbereich. Die Menge der Gesamt-C17-Ketosteroide deckt sich mit den Ergebnissen von KAISER(28).

Wahrscheinlich macht sich die von mir durchgeführte längere Hydrolysedauer beim Androsteron und Ätiocholanolon weniger bemerkbar als beim Dehydroepiandrosteron, denn die ersteren beiden Steroide liegen als Glukuronide vor und werden daher wohl auch durch die nachfolgende starke Hydrolyse nicht vollständiger gespalten als beim Originalverfahren von FEHER, sodaß sich hier die höhere Verlustrate durch die anschließende Aufarbeitung der Extrakte bemerkbar macht. Beim Dehydroepiandrosteron hingegen kann ein Ausgleich der Verluste durch eine höhere Ausbeute angenommen werden.

2.2. Körpergewicht und Ausscheidung von Dehydroepiandrosteron

In ihrer Veröffentlichung hatten SONKA und GREGOROVA(52) eine direkte Abhängigkeit der Dehydroepiandrosterontagesausscheidung von der Aktivität des Pentosephosphatzyklus festgestellt und da nach Ihren Beobachtungen bei Fettsüchtigen ebenfalls eine vermehrte Aktivität auftritt, auf einen Zusammenhang zwischen Fettsucht und Größe der Dehydroepiandrosterontagesausscheidung geschlossen. Die Autoren haben aus ihren Werten eine Regression errechnet, die die Abhängigkeit der Dehydroepiandrosterontagesausscheidung von der Aktivität des Pentose-phosphatzyklus bestätigt.

Leider wurde unterlassen, für die Abhängigkeit des Körpergewichtes von der Dehydroepiandrosteronausscheidung im Tagesharn ebenfalls eine Regressionsberechnung durchzuführen.

Ein Zusammenhang zwischen Körpergewicht und Dehydroepi-

androsterontagesausscheidung wird durch die signifikante Regression (siehe Ergebnisse S. 43 und 44) nachgewiesen. Die Vermutung von SONKA et al. (50) wird damit bestätigt. Allerdings muß an dieser Stelle bemerkt werden, daß die von SONKA et al. vorgenommene Meßmethode der Steroide lediglich auf eine Schätzung der mit dem ZIMMERMANN-Reagenz gefärbten papierchromatographischen Streifen beruhte. Die dabei aufgetragenen aliquoten Urinmengen enthielten im höchsten Falle 3 - 4 μg . Dehydroepiandrosteron. Daß die Fehlermöglichkeiten bei dieser Art der Bestimmung sehr groß sind, liegt auf der Hand. Selbst bei photometrischer Messung der Harne hat sich gezeigt, daß eine Probe, die nicht mindestens 5 μg . C17-Ketosteroide enthält, zu erheblichen Meßfehlern führen kann.

Während SONKA et al. ihre Messungen an fettsüchtigen, sonst aber gesunden Normalpersonen durchgeführt haben, wurden von mir Bestimmungen an Diabetikerinnen und Normalpersonen vorgenommen.

Da bezüglich der Dehydroepiandrosterontagesausscheidung zwischen den Kollektiven der Diabetikerinnen und Normalpersonen bei den von mir durchgeführten Versuchen kein Unterschied besteht, läßt sich der Schluß ziehen, daß lediglich ein Zusammenhang zwischen Körpergewicht und Dehydroepiandrosterontagesausscheidung besteht.

Der von SONKA et al. postulierte Zusammenhang zwischen Diabetes und Dehydroepiandrosterontagesausscheidung (52) kann somit nicht bestätigt werden.

Daß die Kombination Fettsucht und Diabetes gehäuft auftritt ist allgemein bekannt. Statt der von SONKA et al. postulierten diabetogenen Wirkung eines Dehydroepiandrosteronmangels auf Grund der fortfallenden Hemmung des Pentose-phosphat-Zyklus könnte man annehmen, daß der Dehydroepiandrosteronmangel eine Störung des Fettstoff-

wechsels auslöst, in dessen Gefolge wiederum ein Diabetes entstehen kann.

Eine Prüfung, ob Dehydroepiandrosteron tatsächlich einen Einfluß auf den Fettstoffwechsel ausübt, könnte z.B. so stattfinden, daß die Wirkung von Dehydroepiandrosterongaben auf die freien Fettsäuren (FFS) und Triglyceride im Serum sowie auf das Körpergewicht von Fettsüchtigen beobachtet wird.

Zwar ist über die Beeinflussung des Fettstoffwechsels durch Dehydroepiandrosteron selbst nichts bekannt, jedoch geht aus Arbeiten von SCHUBERT(47), KLEMPIN et al.(35) und CONRAD et al.(10) hervor, daß besonders Dehydroepiandrosteronsulfat im Körper in erheblichen Maße in Östrogene und Testosteron umgewandelt werden kann, womit auch die androgene Wirkung des Dehydroepiandrosteron(CONRAD(10)) erklärt wird, denn an sich ist das freie Dehydroepiandrosteron selbst nur sehr schwach androgen wirksam.

Die Androgene und Östrogene haben, wie LARON und SILBERGELD im Tierexperiment(38) einen fettmobilisierenden Effekt.

Die klinischen Beobachtungen, nach denen ein Virilismus mit einer relativen Schlankheit einhergeht, bestätigt diese Ergebnisse.

Es wäre somit eine direkte Beeinflussung des Fettstoffwechsels durch Dehydroepiandrosteron denkbar.

Viel wahrscheinlicher ist es jedoch, daß der Dehydroepiandrosteronmangel nicht Ursache, sondern Folge des pathologisch geänderten Fettstoffwechsels ist. Dafür spricht vor allem die hier ermittelte Regression, die bei zunehmendem Untergewicht eine höhere Ausscheidung an Dehydroepiandrosteron zeigt (Abbildung 5).

Aus den Untersuchungen von SONKA et al. geht hervor, daß diese Korrelation zwischen Körpergewicht und Dehydroepiandrosterontagesausscheidung offenbar auch bei Gesunden

besteht.

Somit läßt sich annehmen, daß alle möglichen externen wie auch internen Ursachen, die zu einer pathologischen Verminderung oder Vermehrung des Depotfettes des Körpers führen, die Dehydroepiandrosteronausscheidung im umgekehrten Sinn beeinflussen. Wie dieser Effekt zustandekommt, kann vorerst nicht erklärt werden.

Darüberhinaus muß bedacht werden, daß die Dehydroepiandrosteronausscheidung auch von anderen Faktoren abhängig ist. So haben z.B. LAURITZEN et al. (40) bewiesen, daß die von der Nebennierenrinde (NNR) ausgeschüttete Dehydroepiandrosteronmenge durch Applikation von ACTH gesteigert wird.

Zum Schluß kann festgestellt werden, daß die vorgenommenen Untersuchungen zwar den vermuteten Zusammenhang zwischen Dehydroepiandrosterontagesausscheidung und Körpergewicht bestätigt haben, jedoch ist es nicht gerechtfertigt, deshalb von einem "Dehydroepiandrosteronmangelsyndrom" zu sprechen, wie es von SONKA et al. postuliert wird.

V. ZUSAMMENFASSUNG

1. In der vorliegenden Arbeit wurden Vergleichsuntersuchungen verschiedener Hydrolysemethoden der C17-Ketosteroide im Urin durchgeführt, um eine optimale Aufarbeitungsmethode zu ermitteln. Insgesamt wurden 368 Analysen im Harn von 71 diabetischen Personen und 21 Normalpersonen vorgenommen.
2. Es konnte bewiesen werden, daß die fraktionierte Hydrolyse der Harne bei verschiedenen pH-Werten und bei gleichzeitiger Anwesenheit von Benzol das ergiebigste Verfahren ist.
3. Anschließend wurde mit dem ermittelten besten Hydrolyseverfahren die Aufarbeitung der Harne einer Gruppe von 37 Diabetikerinnen und 12 gesunden weiblichen Versuchspersonen vorgenommen. In diesen Harnen wurde die Tagesausscheidung der Gesamt-C17-Ketosteroide sowie der drei Ketosteroide Dehydroepiandrosteron, Ätiocholanolon und Androsteron bestimmt.
4. Zwischen dem Kollektiv der Diabetikerinnen und dem der Normalpersonen konnten keine signifikanten Unterschiede in den Ausscheidungsraten festgestellt werden.
5. Eine Varianzanalyse zeigte dagegen, daß bei den Diabetikerinnen eine signifikante Regression zwischen Körpergewicht und Tagesausscheidung an Dehydroepiandrosteron bestand: Untergewicht war mit erhöhtem, Übergewicht dagegen mit erniedrigten Werten für die Dehydroepiandrosterontagesausscheidung verbunden. Für die Gesamt-C17-Ketosteroide, das Ätiocholanolon und das Androsteron war diese Beziehung nicht nachweisbar. Es wird angenommen, daß die veränderte Dehydroepiandrosteronausscheidung eine Folge, nicht aber Ursache von Störungen des Fettstoffwechsels ist.
6. Die methodischen und klinischen Ergebnisse werden im Einzelnen und im Zusammenhang mit der Literatur diskutiert.

LITERATURVERZEICHNIS

1. ALLEN, W.M.: A simple method for analysing complicated absorption curves, of use in the colorimetric determination of urinary steroids. *J. Clin. Endocr.* 10, 71 (1950).
2. BAULIEU, E.E.: Three sulfate esters of 17-ketosteroids in the plasma of normal subjects and after administration of ACTH. *J. Clin. Endocr. Metab.* 20, 900 (1960).
3. BERKOWITZ, D.: Gout, hyperlipidemia and diabetes interrelationships. *JAMA*, 197, 117 (1960).
4. BONGIOVANNI, A.M., W.R. EBERLEIN: The renal clearance of neutral 17-ketosteroids in man. *J. Clin. Endocr.* 17, 238 (1957).
5. BROOKSBANK, B.W.L., D.B. GOWER: The use of thin layer and gas-liquid chromatography in the identification of 5b-Androst-16-En-3a-Ol and Androst-5, 16-Dien-3b-Ol in human urine. *Steroids*, 4, 787 (1964).
6. BURSTEIN, S., S. LIEBERMANN: Hydrolysis of ketosteroid-conjugates by solvolysis procedures. *J. Biol. Chem.* 233, 331 (1958).
7. CALLOW, N.H., R.K. CALLOW, C.W. EMMENS: Colorimetric determination of substances containing the grouping $-CH_2-CO$ in urine extracts as an indication of androgen content. *Biochem. J.* 32, 1312 (1938).
8. CHEIFETZ, P.N.: Uric acid excretion and ketosis in fasting. *Metabolism*, 14, 1267 (1965).
9. COHN, G.L., E. PANCAKE: A standardized technique for the separation of steroids by thin layer chromatography. *Nature*, 200, 75 (1964).
10. CONRAD, S., V. MAHESH, W.L. HERRMANN: Quantitative paper chromatography of conjugated ketosteroids in human plasma. *J. Clin. Invest.*, 40, 947 (1964).
11. CONRAD, S.H., M.C. LINDBERG, W.L. HERRMANN: Significance of plasma dehydroisoandrosterone and androsterone sulfates in the diagnosis of virilizing disorders. *Am. J. Obstetr. Gyn.* 91, 449 (1965).
12. DePAOLI, J.C., E. NISHIZAWA, K.B. EIK-NES: Hydrolysis of conjugated 17-ketosteroids. *J. Clin. Endocr. Metab.* 23, 81 (1961).
13. DESPHANDE, N., R.D. BULBROCK: A method for the simultaneous determination of 17-oxosteroids and 17-hydroxycorticosteroids in human plasma. *J. Clin. Endocr.* 28, 289, (1964).
14. DORFMAN, R.I., R.A. SHIPLEY: The androgens. John Wiley & Sons Inc., New York, 55 (1956).

15. EDWARDS, R.W.H., A.E. KELLIE, A.P. WADE: Memoires of the society for endocrinology 2,53(1953).
16. FEHER, T., G. KOREF, M.H. KAZIK: Simultanbestimmung von freiem Cortisol, estirifizierten Dehydroepiandrosteron und Androsteron im peripheren Blut. Acta Endocrin. 51,429(1966).
17. FEHER, T.: Some aspects of the determination of individual urinary 17-oxosteroids: methodology. Clin. Chim. Acta, 14,83(1966).
18. FEHER, T.: Some aspects of the determination of individual urinary 17-oxosteroids: normal excretion. Clin. Chim. Acta, 14,91(1966).
19. FRANCE, J.T., R. RIVERA, N.L. McNIVEN, R.I. DORFMAN: Determination of androsterone, etiocholanolone and dehydroepiandrosterone in urine by gas-liquid chromatography. Steroids 5,687(1964).
20. GIRARD, A., G. SANDULESCO: Sur une nouvelle série de réactifs du groupe carbonyle, leur utilisation à l'extraction des substances cétoniques et à la caractérisation microchimique des aldéhydes et cétones. Helv. Chim. Acta, 19,1095(1936).
21. GOLDZIEHER, J.W., L.R. AXELROD: The polycystic ovary. II. Urinary steroid excretion. J. Clin. Endocr. 22,425(1962).
22. GOLDZIEHER, J.W., L.R. AXELROD: A study of methods for the determination of total, grouped and individual urinary 17-ketosteroids. J. Clin. Endocr. Metab. 22,1234(1962).
23. GOTTFRIED, H.: The gas chromatographic separation of submicrogram amounts of sex steroids. Steroids 4,387(1964).
24. HAMBURGER, L.: Micro-methods for the determination of 17-ketosteroids in urine. Acta Endocrin. 1,375(1948).
25. HARTMAN, I.S., H.H. WOTIZ: Studies in steroid metabolism. 19. The relation of gas chromatographic retention time to the structure of steroids and derivatives. Biochim. Biophys. Acta 90,334(1964).
26. HOLTORFF, A.F., F.C. KOCH: The colorimetric estimation of 17-ketosteroids and their application to urinary extracts. J. Biol. Chem. 135,377(1940).
27. ISMAIL, A.A.A., R.A. HARKNEES: Estimation of urinary testosterone. Biochem. J. 99,717(1966).
28. KAISER, E., W. RINDT, K.H. CONRAD, W. ZIMMERMANN: Normalscheidung von 17-Ketosteroiden im Harn bei Menschen. Acta Endocrin. 47,285(1964).

29. KELLIE, A.E., A.P. WADE: Steroid conjugates(1). The separation of urinary 17-ketosteroid glucuronides and sulfates and their composition in normal individuals. *Acta Endocrin.* 23, 357(1956).
30. KELLIE, A.E., A.P. WADE: The analysis of urinary 17-oxosteroids by gradient elution. *Biochem. J.* 66, 196(1957).
31. KELLIE, A.E., E.R. SMITH: Renal clearance of 17-oxosteroid conjugates found in human peripheral plasma. *Biochem. J.* 66, 490(1957).
32. KIRSCHNER, M.A., M.B. LIPSETT, H. WILSON: Metabolism of exogenous dehydroepiandrosterone in man. *Acta Endocrin.* 43, 387(1963).
33. KIRSCHNER, M.A., M.B. LIPSETT: The analysis of urinary steroids using gas liquid chromatography. *Steroids* 3, 277(1964).
34. KIRSCHNER, M.A., M.B. LIPSETT: Gas liquid chromatography in the quantitative analysis of urinary 11-desoxy-17-ketosteroids. *J. Clin. Endocrin. Metab.* 23, 255(1963).
35. KLEMPIN, E., K.D. VOIGT, I. TAMM: Der Umsatz von Dehydroisandrosteron in der Hundeleber. *Acta Endocrin.* 36, 498(1961).
36. KÖLBEI, F., I. GREGOROVA, J. SONKA: Defect of urinary dehydroepiandrosterone in hypertensive patients. *Lancet* 2, 99(1964).
37. KROMAN, H.S., M.L. MOSKOVITZ, S.R. BENDER, A.N. BREST: The gas chromatographic separation of micro-quantities of androgens. *J. Gas-Chrom.*, April, 147(1966).
38. LARON, Z., A. KOWADLO-SILBERGELD: Fat mobilizing effect of oestrogens. *Acta Endocrin.* 48, 125(1965).
39. LAU, H.L.: Factors and artifacts in the formation of the trimethylsilyl ethers of steroids. *J. Gas-Chrom.* 1, 136(1966).
40. LAURITZEN, C., W.D. LEHMANN: Ausscheidung von Dehydroepiandrosteron im Neugeborenenharn. Stimulierung durch Choriongonadotropin und ACTH. *Arch. Gyn.* 200, 699(1965).
41. MARKS, P.A., J. BANKS: Inhibition of mammalian glucose-6-phosphate dehydrogenase by steroids. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 46, 447(1960).
42. PETERSON, R.E., A. ZETNER: In standard methods of clinical chemistry. Academic Press, New York, 4, 1951(1963).
43. ROSENFELD, R.S.: Gas chromatography of some C-21 metabolites of cortisol. *Steroids* 4, 147(1964).
44. RUCHELMAN, M.W., V.W. COLE: Analysis of urinary 17-ketosteroids by gas liquid chromatography. *Clin. Chem.* 12, 771(1966).

45. SANDBERG, D.H., N. AHMED, M. ZACHMAN, W.W. CLEVELAND: Measurement of plasma 11-deoxy-17-ketosteroid sulfates by gas liquid chromatography. *Steroids* 6,777(1965).
46. SEGAL, L., B. SEGAL, W.R. NES: The acid-catalysed solvolysis of dehydroepiandrosterone sulfate and its significance in the examination of urinary 17-ketosteroids. *J. Biol. Chem.* 235,3108(1960).
47. SCHUBERT, K.: In vivo Umwandlung von Dehydroepiandrosteronsulphat in Östrogene. *Naturwiss.* 51,312(1964).
48. SJÖVALL, J., R. VIHKO: Determination of androsterone and dehydroepiandrosterone in human serum by gas liquid chromatography. *Steroids* 6,597(1965).
49. SOCIETY OF ACTUARIES: Build and blood pressure 1, Chicago 1959; in *Wissenschaftl. Tab. Geigy* S.588(1960).
50. SONKA, J., I. GREGOROVA, Z. SLABOCHOVA, R. RATH: Ein Beitrag zur Pathologie des Dehydroepiandrosterons bei Fettsucht. *Endokrinologie* 45,115(1963).
51. SONKA, J., I. GREGOROVA: Dehydroepiandrosterone in gout. *Steroids* 4,843(1964).
52. SONKA, J., I. GREGOROVA, M. JIRANEK, F. KÖLBEL, Z. MATHYS: Defekt des Dehydroepiandrosteron—Ein neues Syndrom? *Endokrinologie* 47,152(1965).
53. SONKA, J., I. GREGOROVA: Dehydroepiandrosterone in gout. *Lancet* 1,671(1964).
54. THOMAS, B.S.: In: H.H. WOTIZ, S.J. CLARK: Gas chromatography in the analysis of steroid hormones. Plenum Press, New York, N.Y., p.172.
55. VANDENHEUVEL, W.J.A., B.G. CRESCH, E.C. HORNING: Separation and estimation of the principal human urinary 17-ketosteroids as trimethylsilyl ethers. *Anal. Biochem.* 4, 191(1962).
56. VANDENHEUVEL, W.J.A., J. SJÖVALL, E.C. HORNING: Gas chromatographic behaviour of trifluoroacetoxy steroids. *Biochem. Biophys. Acta* 48,596(1961).
57. VESTERGAARD, P., B. CLAUSSEN: Hydrolysis of 17-ketosteroid conjugates with a procedure based on simultaneous benzene extraction and acid hydrolysis. *Acta Endocrin. Suppl.* 64,35(1962).
58. ZIMMERMANN, W.: Eine Farbreaktion der Sexualhormone und ihre Anwendung zur quantitativen colorimetrischen Bestimmung. *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 233,257(1935).

Zum Schluß erfülle ich die angenehme Pflicht, mich bei Herrn Priv.-Doz. Dr.med. LAUDAHN für die Überlassung des Themas und für die überaus großzügige Unterstützung und Überwachung der Arbeit zu bedanken.

Für die methodische Beratung schulde ich Herrn Priv.- Doz. Dr. Dr. GERHARDS, aus den Hauptlaboratorien der Schering A.G. in Berlin, Dank.

Mein Dank gilt weiterhin Herrn Dr. WARTMANN für die mathematische Auswertung der Meßdaten mittels des Computers.

LEBENS LAUF

Am 5.9.1941 wurde ich als Sohn des Bilanzbuchhalters Ernst Koch und seiner Ehefrau Marie, geb. Wehmeier, in Berlin geboren.

1947 Einschulung in die 13. Grundschule in Berlin-Haselhorst. 1953 Wechsel auf den Technischen Zweig der Carl-Friedrich-von-Siemens-Schule in Berlin Siemensstadt; seit 1955 Besuch des Wissenschaftlichen Zweiges derselben Schule, an der ich 1961 das Abitur bestand. Danach absolvierte ich ein halbjähriges Industriepraktikum und ein Semester Studium des Maschinenbaues an der Technischen Universität Berlin.

Zum Sommersemester 1962 Immatrikulation an der Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin.

1963 bestand ich dort die naturwissenschaftliche Vorprüfung, 1964 die ärztliche Vorprüfung und 1968 das

